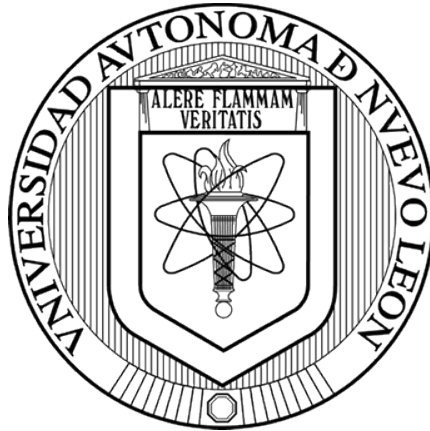


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIVIRAL DE EOSINÓFILOS
HUMANOS CONTRA EL VIRUS DE LA INFLUENZA A H1N1 pdm09**

POR


M.C. ARMANDO SALVADOR FLORES TORRES

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN
CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN INMUNOLOGÍA**

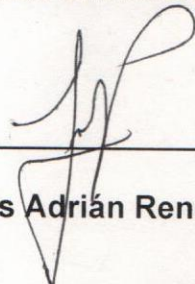
JULIO, 2021

**DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIVIRAL DE EOSINÓFILOS
HUMANOS CONTRA EL VIRUS DE LA INFLUENZA A H1N1 pdm09**

Aprobación de la Tesis:



Dr. C. Adrián G. Rosas Taraco



Dr. med. Luis Adrián Rendón Pérez



Dr. C. Mario César Salinas Carmona



Dr. C. Manuel G. Mejía Torres



Dr. C. Eva María Salinas Miralles



Dr. Med. Felipe Arturo Morales Martínez

**DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIVIRAL DE EOSINÓFILOS
HUMANOS CONTRA EL VIRUS DE LA INFLUENZA A H1N1 pdm09**

Presentado por:

M.C. Armando Salvador Flores Torres

Este trabajo se desarrolló en el Departamento de Inmunología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección del Dr. C. Adrián G. Rosas Taraco.

Director




Dr. C. Adrián G. Rosas Taraco

Codirector



Dr. med. Luis Adrián Rendón Pérez

Miembros de la Comisión



Dr. C. Mario César Salinas Carmona



Dr. C. Manuel G. Mejía Torres



Dra. C. Eva María Salinas Miralles

DEDICATORIA

A todos aquellos que aportaron al menos un granito de arena para la realización de este trabajo. Fueron muchas las personas que me ayudaron, incluyendo profesores, personal del departamento, familiares y amigos. Este logro también es de ustedes.

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, deseo expresar mi agradecimiento al Dr. Adrián Rosas, por todo su apoyo, esfuerzo y dedicación. Gracias por su dirección y confianza. Sin usted no hubiera podido realizar este trabajo.

De igual manera agradezco enormemente a la Dra. Eva Salinas, al Dr. Manuel Mejía, al Dr. Mario Salinas y al Dr. Adrián Rendón, por todo su tiempo, apoyo y orientación.

Agradezco especialmente a los químicos Azalia Martínez y Edgar Montes por toda la ayuda que me ofrecieron durante el proyecto, y por todas las palabras de motivación que me brindaron.

Finalmente, agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada durante cuatro años de estudio.

“Science, my lad, is made up of mistakes, but they are mistakes which it is useful to make, because they lead little by little to the truth.”

—Jules Verne.

RESUMEN

M.C. Armando Salvador Flores Torres
Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Medicina.

Fecha de titulación: Julio, 2021

Título del estudio: Determinación de la actividad antiviral de eosinófilos humanos contra el virus de la influenza A H1N1 pdm09

Número de páginas: 65

Candidato para la obtención del grado de Doctor en Ciencias con Orientación en Inmunología.

Área de estudio: Inmunología

Propósito y diseño del estudio: Las infecciones causadas por el virus de la influenza A (IAV) son de gran importancia debido a la alta morbilidad y mortalidad que originan a nivel mundial. IAV infecta las células uniéndose a residuos de ácido siálico presentes en la superficie celular. Los eosinófilos participan en la respuesta inmune contra muchos patógenos, incluyendo virus. El objetivo de este estudio fue evaluar la expresión del ácido siálico en eosinófilos humanos y su respuesta contra IAV *in vitro*. Se aislaron eosinófilos a partir de sangre periférica de individuos sanos mediante gradiente de Ficoll y selección negativa. Se evaluó la pureza de los eosinófilos mediante citometría de flujo y morfología. Para la identificación del ácido siálico, las células fueron incubadas con las lectinas *Sambucus nigra* y *Maackia amurensis*, posteriormente fueron analizadas por citometría de flujo y microscopía de fluorescencia. Se cultivaron los eosinófilos e incubaron con IAV por 24 horas. A partir del sobrenadante, se cuantificó el título viral y la secreción de IL-8, IL-6 e IFN- γ . Se realizó RT-qPCR para evaluar la expresión de RIG-I, TLR3, TLR7, IFN- β e IFN- λ .

Contribuciones y conclusiones: Los eosinófilos humanos expresan ácido siálico α -2,3 y α -2,6 y son capaces de reducir drásticamente el título viral. Después de la exposición con el virus, los eosinófilos incrementaron la expresión de RIG-I y secretaron altos niveles de IL-8 comparados con el control. Estos datos sugieren un papel importante de los eosinófilos en respuesta al IAV, lo cual puede ser relevante en condiciones como el asma.

FIRMA DEL ASESOR


Dr. C. Adrián G. Rosas Taraco

TABLA DE CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS.....	IX
LISTA DE ABREVIATURAS.....	X
1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES.....	01
1.1 Eosinófilos.....	01
1.1.1 Actividad antiviral.....	03
1.1.1.1 Reconocimiento viral.....	04
1.1.1.2 Moléculas antivirales.....	05
1.1.1.3 Eosinófilos como células presentadoras de antígenos (<i>APC</i>).....	06
1.1.2 Actividad antiviral de eosinófilos contra virus respiratorios.....	07
1.1.2.1 Virus Sincitial Respiratorio (<i>RSV</i>)	07
1.1.2.2 Rinovirus Humano (<i>HRV</i>)	08
1.1.2.3 Virus de Parainfluenza (<i>PIV</i>)	09
1.1.2.4 Virus de Influenza A (<i>IAV</i>)	09
1.2. Virus de la Influenza A.....	11
1.2.1 Generalidades.....	11
1.2.2 Respuesta Inmune contra <i>IAV</i>	13
2. JUSTIFICACIÓN	15
3. HIPÓTESIS.....	16
4. OBJETIVOS.....	17
4.1 Objetivo General.....	17
4.2 Objetivos Específicos.....	17
5.MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
5.1 Estrategia general.....	18

5.2 Líneas celulares	19
5.3 Virus	19
5.4 Detección de IAV mediante RT-qPCR.....	19
5.5 Determinación de la infectividad de IAV.....	20
5.6 Aislamiento de eosinófilos humanos.....	20
5.7 Cultivo de eosinófilos y exposición con IAV.....	22
5.8 Determinación de Ácido Siálico.....	22
5.9 Titulación de IAV	23
5.10 Viabilidad celular	23
5.11 Expresión de RNA mensajero	24
5.12 Cuantificación de citocinas.....	25
5.13 Análisis estadísticos.....	25
6. RESULTADOS	26
6.1 Aislamiento de eosinófilos.....	26
6.2 Expresión de SA en eosinófilos.....	27
6.3 Propagación y semi-purificación de IAV.....	28
6.4 Titulación del virus.....	30
6.5 Expresión de TLR3, TLR7, DDX58, IFNB1 e IFNL1	32
6.6 Cuantificación de IL-8, IL-6 e IFN- γ	35
7. DISCUSIÓN	36
8. CONCLUSIÓN	43
9. PERSPECTIVAS	44
10. REFERENCIAS	45

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Características de los eosinófilos.....	2
Figura 2. Herramientas con actividad antiviral en los eosinófilos.....	6
Figura 3. Respuesta de eosinófilos contra virus respiratorios.....	10
Figura 4. Estructura del virus de la influenza A.....	11
Figura 5. Unión del virus de la influenza a células diana.....	12
Figura 6. Estrategia general.....	18
Figura 7. Aislamiento de PMN a partir de sangre periférica.....	26
Figura 8. Aislamiento de eosinófilos a partir de sangre periférica.....	27
Figura 9. Expresión de SA en eosinófilos humanos.....	28
Figura 10. Efecto citopático ocasionado por IAV en células MDCK.....	29
Figura 11. Presencia de IAV en las muestras concentradas y semi-purificadas..	29
Figura 12. El virus concentrado y semi-purificado mantuvo su capacidad infecciosa.....	30
Figura 13. Los eosinófilos humanos reducen el título viral.....	31
Figura 14. Los eosinófilos expuestos a IAV mantienen la viabilidad celular.....	32
Figura 15. Las muestras de cDNA de eosinófilos amplificaron para el gen endógeno GAPDH.....	33
Figura 16. Los eosinófilos humanos regulan positivamente la expresión de RIG-I después de la exposición con IAV.....	34
Figura 17. Los eosinófilos humanos de sangre periférica no expresan IFNL1	34
Figura 18. Los eosinófilos humanos secretan IL-8 en respuesta a IAV.....	35
Figura 19. Resumen de resultados.....	43

LISTA DE ABREVIATURAS

APC	Del inglés “Antigen Presenting Cell”
APRIL	Del inglés “A Proliferation-Inducing Ligand”
BAL	Del inglés “Bronchoalveolar lavage”
BSA	Del inglés “Bovine Serum Albumin”
CD	Del inglés “Cluster of Differentiation”
cDNA	Del inglés “Complementary DNA”
COPD	Del inglés “Chronic Obstructive Pulmonary Disease”
COVID-19	Del inglés “Coronavirus Disease of 2019”
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DCs	Del inglés “Dendritic Cells”
DMSO	Dimetilsulfóxido
DS	Desviación Estándar
dsRNA	Del inglés “Double-Stranded RNA”
ECP	Del inglés “Eosinophil Cationic Protein”
EDN	Del inglés “Eosinophil Derived Neurotoxin”
EMEM	Del inglés “Eagle’s Minimum Essential Medium”
ETs	Del inglés “Extracellular Traps”
EETs	Del inglés “Eosinophil Extracellular Traps”
EPO	Del inglés “Eosinophil Peroxidase”
F12K	Del inglés “Kaighn’s modification of Ham’s F-12 Medium”
FBS	Del inglés “Fetal Bovine Serum”
GM-CSF	Del inglés “Granulocyte-Monocyte Colony Stimulating Factor”
h	Hora

HA	Del inglés “Hemagglutinin”
HRV	Del inglés “Human Rhinovirus”
IAV	Del inglés “Influenza A Virus”
ICAM-1	Del inglés “Intracellular Adhesion Molecule 1”
IFN	Del inglés “Interferon”
iNOS	Del inglés “Inducible Nitric Oxide Synthase”
IRF	Del inglés “Interferon Regulatory Factor”
IL	Interleucina
MAA	<i>Maackia amurensis</i>
MBP	Del inglés “Major Basic Protein”
MDA	Del inglés “Melanoma Differentiation-Associated Protein 5”
MDCK	Del inglés “Madin-Darby Canine Kidney cells”
MHC	Del inglés “Major Histocompatibility Complex”
MOI	Del inglés “Multiplicity Of Infection”
MyD88	Del inglés “Myeloid Differentiation primary response 88”
NA	Del inglés “Neuraminidase”
NETs	Del inglés “Neutrophil Extracellular Traps”
NF-κB	Del inglés “Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of activated B cells”
NLRs	Del inglés “NOD Like Receptors”
NLRP3	Del inglés “NLR family Pyrin domain containing 3”
NO	Del inglés “Nitric Oxide”
NP	Nucleoproteína
PB1	Del inglés “Polymerase Basic protein 1”
PBS	Del inglés “Phosphate-Buffered Saline”
PIV	Del inglés “Parainfluenza Virus”

PMN	Del inglés “Polymorphonuclear”
PRRs	Del inglés “Pattern Recognition Receptors”
RLRs	Del inglés “RIG Like Receptor”
RNA	Del inglés “Ribonucleic Acid”
ROS	Del inglés “Reactive Oxygen Species”
RPMI	Del inglés “Roswell Park Memorial Institute Medium”
RSV	Del inglés “Respiratory Syncytial Virus”
SA	Del inglés “Sialic Acid”
SARS-CoV2	Del inglés “Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2”
SNA	<i>Sambucus nigra</i>
ssRNA	Del inglés “Single-Stranded RNA”
TCID ₅₀	Del inglés “Fifty-percent Tissue Culture Infective Dose”
TLR	Del inglés “Toll Like Receptor”
TNF	Del inglés “Tumor Necrosis Factor”
WT	Del inglés “Wild-Type”

1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

1.1 Eosinófilos

Los eosinófilos, junto con los neutrófilos y los basófilos, pertenecen al grupo de leucocitos conocido como granulocitos. Se originan a partir de células madre CD34⁺ en médula ósea. El factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) (1), la interleucina (IL)-3 y la IL-5 (2,3) regulan el desarrollo de los eosinófilos, siendo la IL-5 la más específica (4). Una vez maduros, migran a sangre periférica con un tiempo de vida de aproximadamente 18 h (5).

En condiciones fisiológicas, los eosinófilos pueden ser detectados en sangre periférica en números bajos (<450-500 eosinófilos/ μ L) (6). Estas células abandonan el flujo sanguíneo y migran a diferentes sitios anatómicos como tejido adiposo, timo, pulmones, útero, glándulas mamarias y predominantemente al tracto gastrointestinal (7–9). En contraste, en patologías como alergia, asma o infecciones parasitarias, la eosinopoiesis incrementa, constituyendo más del 5% de los leucocitos en sangre periférica (6).

La característica principal de los eosinófilos es el alto contenido de proteínas catiónicas en sus gránulos (**Figura 1**), las cuales son responsables de la tinción con colorantes acidófilos como la eosina. Los gránulos específicos, también conocidos como gránulos secundarios, contienen proteína básica principal (MBP)-1 y MBP-2 en el centro cristalino del gránulo, y las proteínas catiónica del eosinófilo (ECP), peroxidasa del eosinófilo (EPO) y neurotoxina derivada del eosinófilo (EDN) en la

matriz de los mismos (10). Los gránulos de los eosinófilos maduros también contienen citocinas preformadas, quimiocinas y factores de crecimiento (9). Los eosinófilos humanos almacenan de manera constitutiva interferón (IFN)- γ , IL-4, IL-6, IL-10, factor de necrosis tumoral (TNF)- α , IL-12 (p70) e IL-13, las cuales pueden ser liberadas de manera rápida en respuesta a estímulos específicos sin activación de la transcripción (11).

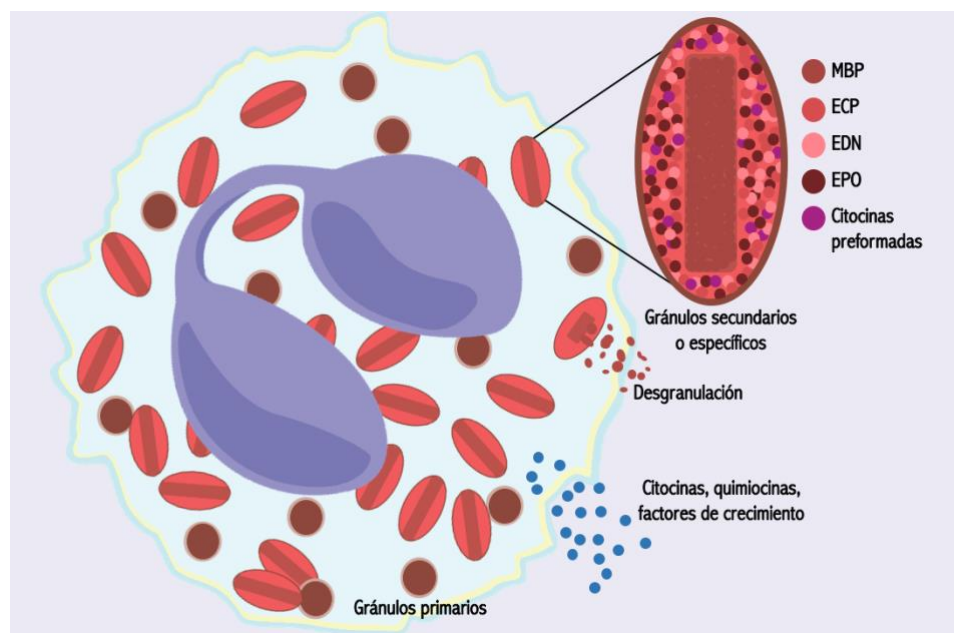


Figura 1. Características de los eosinófilos. ECP: Proteína catiónica del eosinófilo; EDN: Neurotoxina derivada del eosinófilo; EPO: Peroxidasa del eosinófilo; MBP: Proteína básica principal.

Los eosinófilos se han preservado durante la evolución y se encuentran presentes prácticamente en todos los vertebrados (7,12). Por muchos años, el papel benéfico de los eosinófilos se centró casi exclusivamente en su respuesta contra parásitos helmintos (13,14). Sin embargo, con el desarrollo de ratones deficientes de eosinófilos, esta visión cambió (15,16). En las infecciones por helmintos como

Strongyloides stercoralis y *Schistosoma mansoni*, los eosinófilos son dispensables en la protección del hospedador tanto en respuestas primarias como secundarias (17,18). En otros casos pueden incluso jugar un papel benéfico para el parásito. Por ejemplo, la ausencia de eosinófilos disminuye el crecimiento de las larvas de *Trichinella spiralis* y su sobrevivencia en el músculo esquelético (19,20). En contraste, la presencia de eosinófilos o sus productos está asociada a enfermedades que afectan piel, vías aéreas y tracto gastrointestinal (21). Desde un punto de vista evolutivo, un tipo celular no persistiría si la mayoría de sus funciones fueran dañinas para el huésped, por lo que deben existir otras funciones que expliquen su presencia.

Recientemente, algunos estudios han demostrado funciones del eosinófilo no descritas previamente, lo que ha llevado a cambiar la descripción tradicional de los eosinófilos como “células inflamatorias involucradas en la protección contra parásitos helmintos”. Entre estas funciones se encuentran el papel del eosinófilo en el mantenimiento de la homeostasis al secretar citocinas como IL-4, necesaria para el mantenimiento de los macrófagos activados con fenotipo alternativo en el tejido adiposo (22) y APRIL, que genera y preserva células plasmáticas productoras de IgA en el tracto gastrointestinal (23). Además, se ha reportado la participación del eosinófilo en la respuesta contra el cáncer (24) y en la respuesta inflamatoria en infecciones por bacterias, hongos y virus (25), principalmente virus respiratorios (26).

1.1.1 Actividad antiviral

Cuando se piensa en la respuesta inmune antiviral, usualmente no se tiene en mente a los eosinófilos como células efectoras. Sin embargo, los eosinófilos

contienen una gran variedad de sensores que permiten la detección y respuesta contra diferentes patógenos virales (**Figura 2**) (27). Estas células tienen mecanismos antivirales complejos e incluso participan en la iniciación de las respuestas adaptativas mediadas por células T (26). Los eosinófilos se encuentran en condiciones fisiológicas en tejidos como el pulmón (28) y sus niveles aumentan en las enfermedades alérgicas (incluyendo asma y rinitis (29)), así como algunos casos de helmintiasis (15) donde los eosinófilos con fenotipo inflamatorio son reclutados a las vías aéreas y pueden establecer contacto con virus respiratorios.

1.1.1.1 Reconocimiento viral

Los eosinófilos expresan una gran variedad de receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), incluyendo los que participan en el reconocimiento viral. Entre estos encontramos principalmente a los receptores tipo *Toll* (TLR3, TLR7 y TLR9) (30-32). TLR7 es un receptor endosomal que reconoce RNA de cadena sencilla (ssRNA) (33) y es el TLR que más se expresa en los eosinófilos (34). Cuando se administra R-848, un ligando sintético del TLR7, en eosinófilos, se induce la producción del radical superóxido (34), sugiriendo el posible papel antiviral de estas células contra virus ssRNA. Aunque TLR8 no es expresado de manera constitutiva, es posible su inducción mediante IFN- γ (34). El gen I inducido por ácido retinoico (RIG-I), también conocido como DDX58, así como el gen-5 asociado a la diferenciación de melanoma (MDA-5), ambos sensores intracelulares de daño, se expresan en eosinófilos, aunque a niveles bajos (35). Estos sensores forman parte de los receptores tipo RIG (RLR). RIG-I reconoce RNA con secuencias 5'-ATP

terminales (36), mientras que MDA-5 reconoce secuencias largas de RNA de doble cadena (dsRNA) (37).

1.1.1.2 Moléculas antivirales

Los eosinófilos poseen moléculas y mecanismos con potencial antiviral. La ECP no solo posee actividad antibacteriana (38,39) y antiparasitaria (38,40), también es miembro de la superfamilia de ribonucleasas A junto con la EDN (41). Se ha demostrado que ambas proteínas presentan actividad de RNasa (42,43) por lo que podrían presentar actividad contra virus de RNA.

Los eosinófilos también son capaces de producir especies oxidantes mediante EPO, la cual utiliza el peróxido de hidrógeno como sustrato para producir especies reactivas del oxígeno (ROS) (44,45). También producen óxido nítrico (NO) a través de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) (46), y este inhibe la replicación de virus patógenos, incluyendo influenza (47,48).

A pesar de que los eosinófilos se asocian con respuestas tipo 2, también son capaces de producir citocinas tipo 1, proinflamatorias y antiinflamatorias (11,49). Los gránulos del eosinófilos contienen IL-2, IL-12 e IFN- γ (11,50), las cuales son citocinas tipo 1 asociadas con la respuesta antiviral (51,52).

De manera similar a los neutrófilos, los eosinófilos son capaces de producir trampas extracelulares (ETs) (53,54) y se ha sugerido que este mecanismo podría tener

actividad antiviral (55). En un trabajo reciente se demostró que los eosinófilos de ratones con asma liberan trampas extracelulares de eosinófilos (EETs) *in vitro* en respuesta al virus sincitial respiratorio (56).

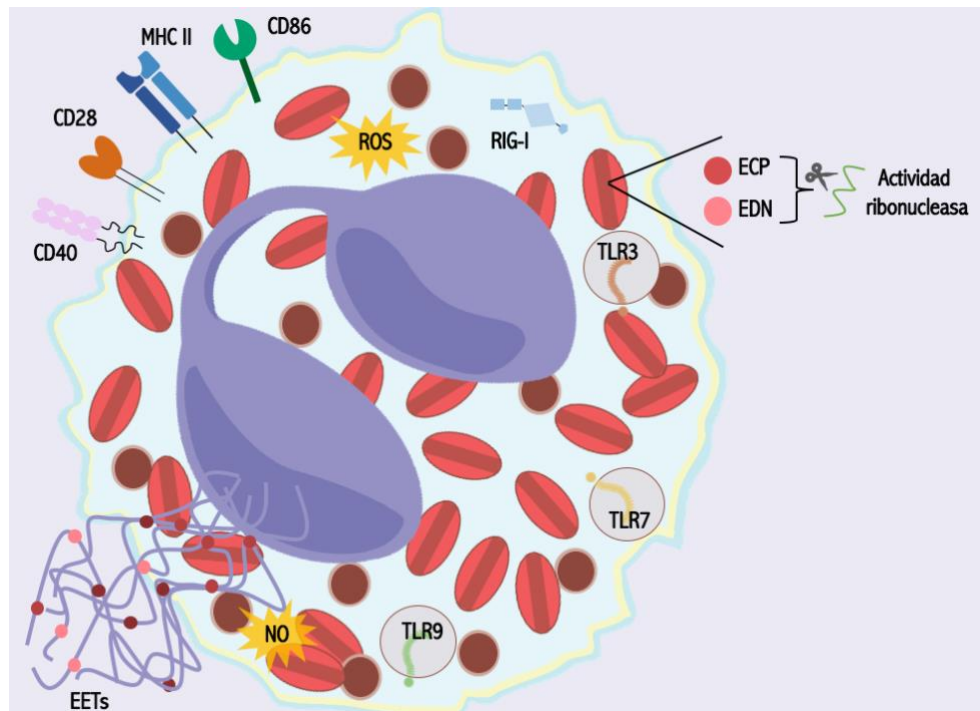


Figura 2. Mecanismos efectores del eosinófilo con actividad antiviral. ECP: Proteína catiónica del eosinófilo; EDN: Neurotoxina derivada del eosinófilo; EETs: trampas extracelulares del eosinófilo; ROS: Especies reactivas del oxígeno; NO: Óxido nítrico. TLR: Receptor tipo Toll.

1.1.1.3 Eosinófilos como células presentadoras de antígenos (APC)

Aunque los eosinófilos no expresan de manera constitutiva moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) clase II, estas pueden ser inducidas *in vitro* mediante GM-CSF (57–59), IL-4 e IFN- γ (60). Además, los eosinófilos expresan las moléculas coestimuladoras CD80 (59), CD86 (59,61), CD28 (61) y CD40 (59,62).

La expresión de moléculas del MHC clase II se ha corroborado clínicamente en eosinófilos recuperados del lavado broncoalveolar (BAL) en pacientes atópicos después del reto con alérgeno (63,64) y en las secreciones bronquiales de pacientes asmáticos (65).

El papel del eosinófilo como célula APC (58,59) se ha demostrado para antígenos virales (40,66). Este mecanismo del eosinófilo es capaz de inducir la secreción de citocinas en linfocitos T (58,59,66–68). Es interesante señalar que los eosinófilos tienen capacidad de migración a los ganglios linfáticos, sitios donde pueden presentar antígenos a los linfocitos T (59,66,69).

1.1.2 Actividad antiviral de eosinófilos contra virus respiratorios

a) Virus sincitial respiratorio (RSV)

La primera vez que se estableció una relación entre el eosinófilo y la actividad antiviral fue a finales de los años 1960s durante los ensayos clínicos de la vacuna RSV inactivada con formalina. Esta vacuna causó la muerte de dos pacientes pediátricos por exposición a la variante nativa del virus RSV (*wild-type RSV*) (70). De acuerdo con los hallazgos histopatológicos publicados, los casos fatales presentaron “una infiltración peribronquial monocítica con exceso de eosinófilos” (70,71). Sin embargo, esta descripción no fue precisa, ya que las principales células infiltradas fueron los neutrófilos y las células mononucleares (71,72). Esta imprecisión originó que los investigadores concluyeran erróneamente que los eosinófilos eran responsables del fenómeno observado (71).

Las controversias de estas observaciones condujeron a algunos investigadores a evaluar el papel antiviral de los eosinófilos contra RSV. Los eosinófilos humanos son susceptibles de ser infectados por RSV y responden secretando IL-6 (73). Los eosinófilos son capaces de reducir la infectividad y la replicación de RSV mediante ECP y EDN (74), ya que ambas poseen actividad de RNasa (41). Mediante estudios *in vivo* se ha demostrado que los ratones que presentan un mayor número de eosinófilos presentan un título viral disminuido (31,75) y que este fenómeno ocurre mediante la activación de la vía de señalización MyD88 iniciada por TLR7 (31,73). Esta vía induce la producción de citocinas con actividad antiviral y NO (**Figura 3A**) (31,75).

b) Rinovirus humano (HRV)

El rinovirus humano (HRV) puede unirse a eosinófilos humanos a través de ICAM-1 *in vitro* (67) y este receptor es sobre-expresado en eosinófilos de BAL de pacientes con asma alérgica (63). La incubación de eosinófilos de sangre periférica con HRV demostró por primera vez la capacidad de estas células de funcionar como APC en respuesta a antígenos virales, induciendo la proliferación de linfocitos T CD4⁺ y la secreción de IFN-γ (**Figura 3B**) (67). En una publicación reciente, donde pacientes con asma moderada fueron tratados con Mepolizumab (anticuerpo monoclonal humanizado anti-IL-5) y posteriormente retados con HRV, el grupo que recibió el monoclonal mostró un título viral aumentado comparado con el grupo que recibió placebo (76), indicando un posible papel antiviral de los eosinófilos.

c) Virus de Parainfluenza (PIV)

Los eosinófilos humanos son susceptibles a la infección por PIV *in vitro* y pueden reducir el título viral, efecto que es incrementado cuando los eosinófilos son pre-incubados con IFN- γ (77). El mecanismo por el cual los eosinófilos inactivan al virus requiere la producción de NO inducido por TLR7 (77) y posiblemente participen las proteínas catiónicas (**Figura 3C**) (78).

En estudios realizados en ratones y cobayos sensibilizados y retados con OVA vía intratraqueal (estímulo que induce un reclutamiento importante de eosinófilos en las vías aéreas) se observó una reducción significativa de los títulos virales en infecciones posteriores (77,79). Un efecto parecido se observó en la línea de ratones transgénicos NJ.1726 que presentan un número incrementado de eosinófilos en vías aéreas (77).

d) Virus de la Influenza A (IAV)

Durante la pandemia de influenza de 2009, en un estudio de comorbilidades, se reportó que los pacientes con asma presentaron complicaciones menos severas relacionadas con la infección viral comparado con la presencia de otras comorbilidades (80–84). A partir de estas observaciones es que se han realizado estudios donde se evalúa la capacidad antiviral de los eosinófilos contra influenza. Mediante estudios *in vitro* se ha determinado que los eosinófilos de ratón son susceptibles a la infección por IAV, induciendo la desgranulación y la sobreexpresión de moléculas MHC clase I y CD86. Los eosinófilos expuestos a

antígenos de IAV poseen la capacidad de actuar como APC frente a células T CD8⁺ induciendo la secreción de IFN- γ y TNF- α (**Figura 3D**) (66). En eosinófilos humanos no se ha demostrado la susceptibilidad a la infección por el virus, pero estas células tienen la capacidad de unirse a IAV y reducir su infectividad. De manera interesante, los eosinófilos que provienen de individuos asmáticos presentan defectos en su capacidad de unión al virus (85).

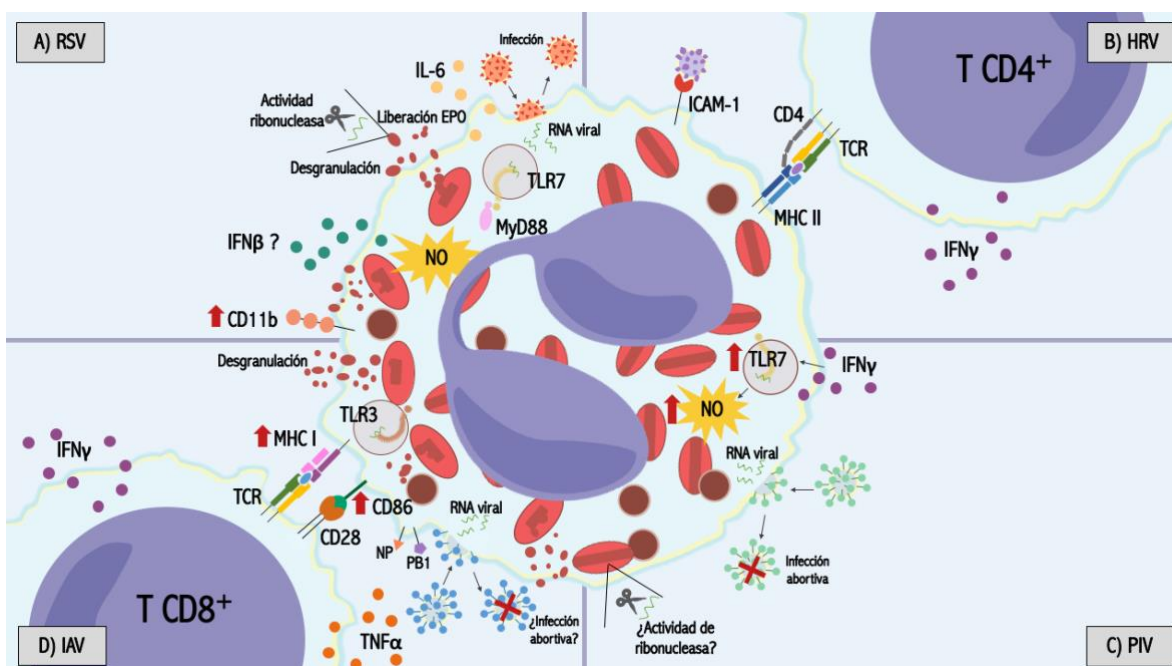


Figura 3. Respuesta de eosinófilos contra virus respiratorios. A) RSV induce la sobre-expresión de CD11b y la desgranulación y secreción de IL-6. RSV es reconocido por TLR7, lo que induce la producción de NO. B) HRV se une al eosinófilo a través de ICAM-1. Los eosinófilos presentan péptidos virales a linfocitos T CD4⁺. C) La replicación del virus de parainfluenza es interrumpida en eosinófilos humanos. El mediador NO es la principal molécula antiviral en el eosinófilo y su producción está mediada por TLR7. D) El virus de la influenza puede replicarse en eosinófilos. Este virus induce la desgranulación del eosinófilo y la sobre-expresión de moléculas MHC-I y CD86. Los eosinófilos presentan péptidos a linfocitos T CD8⁺. IAV: Virus de influenza A; ICAM: Molécula de adhesión intercelular; IFN: Interferón; IL: Interleucina; MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad; NP: Nucleoproteína; PB1: Proteína básica polimerasa 1; HRV: Rinovirus humano; RSV: Virus sincitial respiratorio; TNF: Factor de necrosis tumoral.

En estudios *in vivo*, combinando modelos de asma alérgica con modelos de infección por IAV, se ha determinado que los ratones alérgicos presentan un aumento de la eliminación de IAV, un mayor número de linfocitos T CD8⁺ y menor daño epitelial. De manera contrastante, los ratones deficientes de eosinófilos presentan un título viral incrementado y un menor número de linfocitos T CD8⁺ (66). Estos datos sugieren que el número elevado de eosinófilos induce un aumento de la inmunidad celular.

1.2 Virus de la Influenza A (IAV)

1.2.1 Generalidades

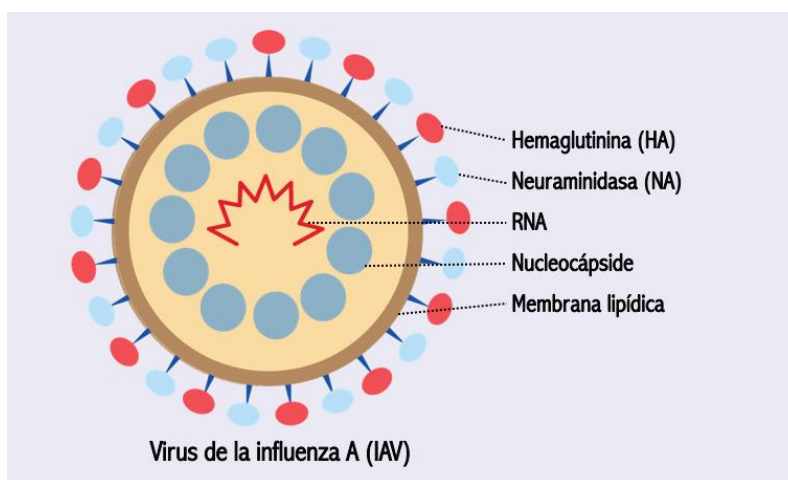


Figura 4. Estructura del virus de la influenza.

Los virus de la influenza pertenecen a la familia *Orthomyxoviridae* y son los agentes causales de la influenza, enfermedad respiratoria de importancia en los seres humanos debido a su alta tasa de morbilidad y mortalidad en todo el mundo (86). La estructura viral contiene ssRNA de polaridad negativa con cubierta lipídica y un

genoma segmentado (**Figura 4**). El género del virus de la influenza está dividido en tipos A, B, C y D. Los virus de la influenza A y B causan epidemias estacionales durante el invierno (86,87). Las epidemias estacionales causadas por IAV ocasionan entre 3 y 5 millones de casos de enfermedad respiratoria severa y entre 290,000 y 650,000 muertes en todo el mundo cada año (88). Dentro de los virus de influenza, el tipo A es el único virus con posibilidad de originar pandemias (89).

IAV se clasifica en subtipos en base a la combinación de las glucoproteínas de superficie hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA) (87). La HA se une a residuos de ácido siálico (SA) expresados en la superficie de las células diana, mediando de esta manera su unión y entrada (**Figura 5**) (86,87). El SA se encuentra generalmente en las cadenas terminales de glucanos en las células de mamífero, usualmente unidos a galactosas vía enlaces $\alpha 2,3$ o $\alpha 2,6$ (90). Los virus de influenza A aviar se unen preferentemente a $SA\alpha 2,3$, mientras que los virus de influenza A que infectan humanos se unen preferentemente a $SA\alpha 2,6$ (90,91). Una vez dentro de la célula, el virus utiliza la maquinaria celular para su replicación (86).

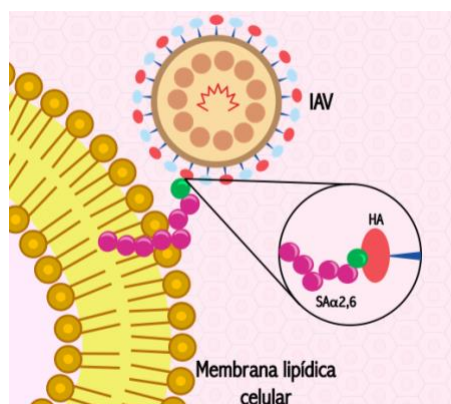


Figura 5. Unión del virus de la influenza a células diana. HA: Hemaglutinina; IAV: Virus de la influenza A; SA: Ácido siálico

1.2.2 Respuesta inmune contra IAV

IAV entra al huésped a través de las cavidades orales o nasales. La primera línea de defensa la constituye la cubierta de moco que recubre el epitelio respiratorio. Si el virus atraviesa esta cubierta, podrá infectar las células epiteliales subyacentes. La infección inicial activa la respuesta inmune innata, constituida por macrófagos alveolares, DCs, neutrófilos y células NK (92,93). Algunos componentes de la estructura viral son reconocidos por PRRs en células epiteliales y células del sistema inmune. IAV es reconocido por al menos tres diferentes clases de PRRs: RLRs, TLRs y receptores tipo NOD (NLRs), los cuales inducen la secreción de IFN y citocinas proinflamatorias (93).

a) RLRs

El RNA no propio en el citoplasma es reconocido por RIG-I y MDA-5 (94). RIG-I es el principal receptor que detecta ssRNA intracelular. Este PRR reconoce específicamente ssRNA viral con la etiqueta 5'trifosfato terminal generado después de la replicación viral (93). La señalización por RIG-I induce la activación de los factores reguladores de interferones (IRF)3 e IRF7 y de NF- κ B, factores reguladores de la transcripción que desencadenan la expresión de citocinas inflamatorias e IFNs (95).

b) TLRs

Los TLRs son PRRs que se encuentran en la membrana celular y en membranas de endosomas y lisosomas donde participan en el reconocimiento de una gran

variedad de patrones moleculares de patógenos. TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9 se expresan en endosomas y lisosomas donde reconocen ácidos nucleicos virales, incluido IAV (94). TLR3 reconoce dsRNA y TLR7/TLR8 reconocen ssRNA (93). La señalización de estos receptores induce la activación de IRF3, IRF7 y NF- κ B, lo que induce la producción y secreción de TNF- α , IL-6, IL-1 β e IFNs tipo I como IFN- β y tipo III como IFN- λ (94).

c) NLRs

Los NLRs reconocen una variedad amplia de componentes microbianos y patrones moleculares asociados a daño. Están conformados por más de 20 sensores citoplasmáticos (27). Los NLRPs (NLR con dominio tipo pirina en su extremo N-terminal) forman estructuras multiprotéicas conocidas como inflamasomas, constituidos por un NLRP (u otro PRR), el adaptador ASC y la pro-caspasa 1. IAV es capaz de inducir la activación del inflamasoma NLRP3, lo que conduce al procesamiento y liberación de IL-1 β e IL-18 activas (96).

Los IFNs tipos I y III restringen la replicación viral durante la primera etapa de infección, antes de la activación del sistema inmune adaptativo (97). La respuesta inmune adaptativa, caracterizada por la activación de linfocitos T y B, es crítica para la eliminación del virus en etapas tardías de la infección. Los anticuerpos neutralizantes producidos por los linfocitos B en cooperación con los linfocitos T CD4⁺ bloquean las partículas virales y evitan la infección de más células en el epitelio respiratorio (98).

2. JUSTIFICACIÓN

Las infecciones respiratorias humanas causadas por el virus de la influenza son de gran importancia debido a la alta morbilidad y mortalidad que causan a nivel mundial. Durante la pandemia de influenza A H1N1 en 2009, el asma fue una comorbilidad asociada a mayor riesgo de hospitalización. Sin embargo, los pacientes asmáticos presentaron menores probabilidades de presentar complicaciones graves o muerte asociada a la infección viral comparado con otras comorbilidades. A pesar de que está reportada la actividad antiviral de los eosinófilos contra virus respiratorios, se desconocen los mecanismos que pudieran estar implicados, particularmente en eosinófilos humanos.

3. HIPÓTESIS

Los eosinófilos humanos expresan ácido siálico en la membrana celular y presentan actividad antiviral contra el virus de la influenza pandémica A H1N1 de 2009.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la expresión de ácido siálico en la membrana celular de eosinófilos humanos y su actividad antiviral contra el virus de la influenza A H1N1 de 2009.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar la expresión de ácido siálico $\alpha 2,6$ y $\alpha 2,3$ en eosinófilos humanos.
2. Determinar el título viral de cultivos de eosinófilos incubados con el virus de la influenza A H1N1 pdm09.
3. Analizar la expresión de TLR3, TLR7, DDX59, IFNB1 e IFNL1 en eosinófilos humanos incubados con el virus de la influenza A H1N1 pdm09.
4. Cuantificar la secreción de IL-8, IL-6 e IFN- γ en cultivos de eosinófilos humanos incubados con el virus de influenza A H1N1 pdm09.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

Estrategia general

Los eosinófilos se aislaron a partir de sangre periférica obtenida de donadores sanos y fueron evaluados para la expresión de ácido siálico en la membrana celular. Para los experimentos de exposición con IAV, los eosinófilos fueron incubados por 24 h en las siguientes condiciones: un grupo sin infección (control), un grupo con IAV [multiplicidad de infección (MOI) 0.1 ó MOI 1] y un grupo con el control positivo de activación R848. A partir de los sobrenadantes se cuantificó el título viral y la secreción de citocinas; se utilizó el botón celular para realizar la expresión de RNA mensajero por RT-qPCR.

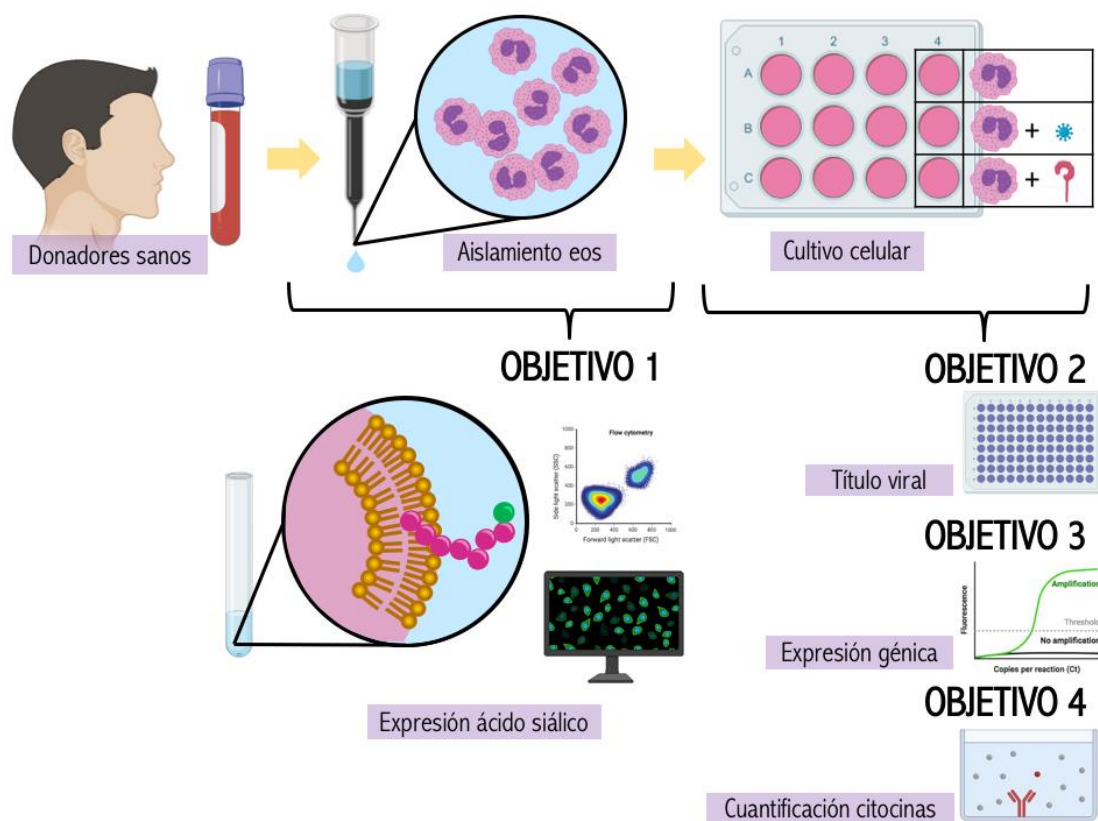


Figura 6. Estrategia general

Líneas celulares

Las células MDCK (NBL-2; ATCC, Manassas, VA, USA) fueron cultivadas en medio EMEM suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10%. Las células A549 (ATCC, Manassas, VA, USA) se cultivaron en medio F12K suplementado con FBS al 10% y 2mM de L-glutamina. La línea celular THP-1 (ATCC; TIB-202) fue cultivada en medio RPMI-1640 suplementado con FBS al 10%, 2mM de L-glutamina y 0.05mM de 2-mercaptoetanol.

Virus

Se utilizó el virus de la influenza A/Virginia/ATCC1/2009. Se generó un *stock* viral por propagación en células MDCK (infección con IAV, MOI 0.1) en medio de infección (MEM, 1 µg/mL de tripsina TPCK, 10mM de HEPES y 0.125% de BSA) hasta observar un efecto citopático en más del 90% de las células (2-5 días). Después de la cosecha, el debris celular fue precipitado por centrifugación (10,000xg por 10 minutos a 4°C). Para remover factores solubles de origen celular, el IAV fue concentrado y parcialmente purificado utilizando un filtro centricon de peso molecular 100,000 Da (Millipore, Billerica, MA). El virus fue titulado con la técnica de la dosis infectiva 50 (TCID₅₀) (99) y congelado en alícuotas de un solo uso a -80°C.

Detección de IAV mediante RT-qPCR

Se extrajo el RNA viral de las muestras de virus concentrado y semi-purificado utilizando el kit QIAamp MinElute Virus Spin (QIAGEN, Hilden, Germany) y posteriormente se realizó RT-qPCR utilizando Brilliant III Ultra Fast qRT-PCR Master

Mix (Agilent Technologies, Cat. 600884) y el kit Primer Design Advanced (Premier Biosoft, Palo Alto, CA) siguiendo los protocolos del fabricante.

Determinación de la infectividad de IAV

Se infectaron células MDCK con el virus concentrado y semi-purificado con una MOI de 1 por 48 h. Posteriormente las células fueron fijadas con formaldehído al 4% e incubadas con el anticuerpo monoclonal IgG2a anti-NP de ratón (ab128193, Abcam) y posteriormente con anticuerpo anti-IgG de ratón conjugados con FITC. Se marcó el núcleo de las células utilizando DAPI y se adquirieron imágenes representativas en el microscopio de fluorescencia Fluid cell imaging station (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA).

Aislamiento de eosinófilos humanos

El estudio fue aprobado por el Comité de Bioética de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León con el número de registro IN18-0003. Se reclutaron donadores sanos con los siguientes criterios de inclusión, exclusión y eliminación:

Criterios de inclusión:

- Voluntarios mayores de 18 años de edad sin importar sexo.
- Sin ninguna enfermedad.
- Biometría hemática con cuenta de eosinófilos normal (<350 células/ μ L).

Criterios de exclusión:

- Presencia de cualquier padecimiento agudo o crónico.
- Internamiento en los tres meses previos por más de 48 h por cualquier causa.
- Uso de cualquier medicamento
- Mujeres embarazadas

Criterios de eliminación:

- Baja cantidad de muestra.
- Mala calidad de la muestra.

Aquellos donadores que cumplieron con el perfil deseado se les informó acerca del estudio y se les invitó a participar en el mismo. A los sujetos que aceptaron participar se les solicitó la firma de un consentimiento informado. Se obtuvieron aproximadamente 30mL de sangre periférica recolectados en tubos con EDTA como anticoagulante. La muestra de sangre se colocó en un tubo cónico de 50mL y posteriormente se les añadió solución de dextrán al 6% para eritrosedimentación, incubando a temperatura ambiente por 25 minutos. La eliminación de linfocitos, monocitos y basófilos se realizó por gradiente de densidad con Ficoll-diatrizoato de sodio. Después de realizar un lavado se lisaron los eritrocitos con agua destilada estéril. Finalmente, los eosinófilos se separaron de la suspensión de polimorfonucleares (PMN) mediante selección negativa utilizando microperlas magnéticas anti-CD16 (Milteny Biotec, Auburn, CA). La pureza del aislamiento se corroboró por morfología celular utilizando cytospin y tinción de Wright, así como

citometría de flujo utilizando anticuerpos anti-Siglec-8 (APC; Biolegend, San Diego, CA) y anti-CCR3 (FITC; Biolegend, San Diego, CA).

Cultivo de eosinófilos y exposición con IAV

Se incubaron 600,000 eosinófilos por pocillo en placas de 12 pocillos con IAV (MOI 0.1 ó 1) o solo medio como control por 1 h. Después se realizó un lavado para remover el virus no adherido y se mantuvieron las células en medio fresco (RPMI, 10% FBS, 2mM de L-glutamina, 100 U/mL de penicilina y 100µg/mL de estreptomicina) por 24 h en una incubadora con 5% de CO₂.

Determinación de ácido siálico

Las líneas celulares MDCK, A549 y los eosinófilos aislados fueron teñidos para la identificación de SA α 2,6 y SA α 2,3 por microscopía de fluorescencia y citometría de flujo (100). Brevemente, las células MDCK y A549 cosechadas con tripsina o los eosinófilos aislados, fueron fijados con 2% de formaldehído por 30 minutos a 4°C y posteriormente lavados con *Flow buffer* (PBS con 1% de BSA). Las células se incubaron con 20µg/mL de la lectina *Maackia amurensis*-II biotinilada (MAA II; Vector Laboratories, Burlingame, CA) para detectar SA α 2,3. Para SA α 2,6 se utilizaron 20µg/mL de *Sambucus nigra* marcada con fluoresceína por 1 h a 4°C. Para la detección de SA α 2,3 se requirió un paso adicional de revelado con estreptavidina conjugada con APC (BD biosciences, Mountain View, CA) en dilución 1:250 en *Flow buffer* por 1 h a 4°C. Después del lavado celular con *flow buffer*, se evaluó la expresión de receptores utilizando el citómetro de flujo FACS CANTO II, utilizando para el análisis de los datos citométricos *FlowJo* version 10 para Windows

(Treestar, Ashland, OR). Se analizaron al menos 10,000 eventos de cada muestra. Para la evaluación de receptores por inmunofluorescencia, al marcaje anterior se agregó DAPI para visualizar los núcleos y finalmente se adquirieron imágenes representativas en el microscopio de fluorescencia Fluid cell imaging station (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA).

Titulación de IAV

Se cultivaron 850,000 eosinófilos por pocillo en placas de 12 pocillos y fueron incubados con IAV (MOI 1) o solo medio como control por 1 h. Se mantuvieron las células en medio fresco (RPMI, 10% FBS, 2mM de L-glutamina, 100 U/mL de penicilina y 100µg/mL de estreptomicina) por 24 h en una incubadora con 5% de CO₂. Después de la incubación, se obtuvieron los sobrenadantes de los cultivos celulares y se evaluó el título viral mediante el método TCID₅₀ utilizando células MDCK.

Viabilidad celular

La viabilidad celular fue evaluada durante cada aislamiento mediante la tinción de azul tripano, obteniendo siempre viabilidades >95%. La viabilidad celular de eosinófilos cultivados solos o con IAV fue analizada utilizando el kit Calcein Blue AM (BD biosciences, Mountain View, CA) por citometría de flujo utilizando el protocolo del fabricante.

Expresión de RNA mensajero

El RNA total fue aislado utilizando el kit Rneasy Mini Kit (QIAGEN, Valencia, CA) y almacenado a -80°C hasta su uso. La concentración de RNA obtenido estuvo en el rango de 2.1-10.2 ng/μL con relación de absorbancias A260/280 con valores entre 1.7-2.2. Posteriormente, se realizó la retrotranscripción con M-MLV (New England Biolabs, Ipswich, MA) y hexámeros aleatorios (Agilent Technologies, La Jolla, CA). La concentración de cDNA obtenido estuvo en el rango de 671-1197.4 ng/μL con relación A260/280 en el rango de 1.67-1.75. La qPCR fue realizada utilizando iQ SYBR Green Supermix ó IQ Supermix (Biorad, Hercules, CA), primers específicos (Alpha DNA, Montreal, Quebec) y/o sondas Taqman (Applied Biosystems, Grand Island, NY) en un termociclador CFX96 (Biorad, Hercules, CA). Se realizó la expresión relativa de mRNA de los genes TLR3, TLR7, DDX58 (RIG-I), IFNB1 e IFNL1 (IFNlambda1, Hs00601677g1 de Thermo Fisher Scientific). Se utilizó GAPDH como gen endógeno. Las secuencias de los primers utilizados son las siguientes:

GAPDH F TGCCAAATATGATGACATCAAGAA; GAPDH R
GGAGTGGGTGTCGCTGTTG; TLR3 F AAATTAAAGAGTTTTCTCCAGGGTGTT;
TLR3 R ATTCCGAATGCTTGTGTTTGC; TLR7 F
TTGAGAAGCCCTTTCAGAAGTC; TLR7 R CACCTGACTATAGGCCACATGA;
DDX58 F CCAAGCCAAAGCAGTTTTCAAG; DDX58 R
CACATGGATTCCCCAGTCATG; IFNB1 F CAGCAATTTTCAGTGTGTCAGAAGC;
IFNB1 R TCATCCTGTCCTTGAGGCAGT.

Cuantificación de citocinas

Se cuantificó la secreción de IL-8, IL-6 e IFN- γ a partir de los sobrenadantes de cultivo por medio de estuches comerciales de ELISA (Thermo Fisher Scientific, Vienna, Austria), siguiendo los protocolos del fabricante.

Análisis estadísticos

Los resultados obtenidos se analizaron mediante el programa GraphPad PRISM version 4 (Graph Pad Software, San Diego, C.A.). La significancia fue determinada mediante las pruebas t-Student y ANOVA de una vía con *post hoc* de Bonferroni para la comparación de 2 y más de 2 grupos, respectivamente. En el caso de datos no paramétricos, se utilizó Kruskal-Wallis con *post hoc* de Dunn para comparaciones de más de 2 grupos. Los valores de $P < 0.05$ fueron considerados significativos.

6. RESULTADOS

6.1 Aislamiento de eosinófilos

Primeramente, se aislaron células PMN utilizando gradiente de ficoll-diatrizoato de sodio. La gran mayoría de las células aisladas fueron neutrófilos (**Figura 7**).

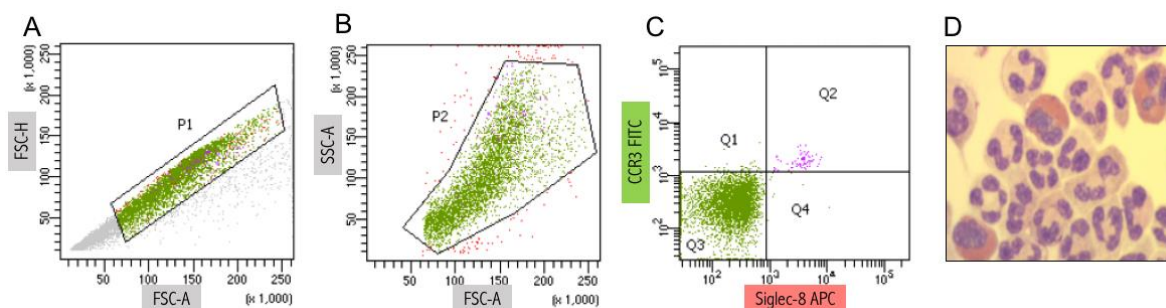


Figura 7. Aislamiento de PMN a partir de sangre periférica. Se aislaron PMN utilizando gradiente de ficoll y se determinaron las poblaciones celulares mediante citometría de flujo y morfología. **A)** Selección de células individuales. **B)** Selección de granulocitos. **C)** Neutrófilos (CCR3⁻ Siglec-8⁻) y eosinófilos (CCR3⁺ Siglec-8⁺) **D)** Determinación de las poblaciones celulares mediante citología con tinción de Wright.

Al utilizar microperlas magnéticas anti-CD16, la mayor parte de las células aisladas fueron eosinófilos, con purezas del 95-99% (**Figura 8**). La viabilidad de los eosinófilos aislados, determinada con la tinción de azul tripano, siempre fue >95%.

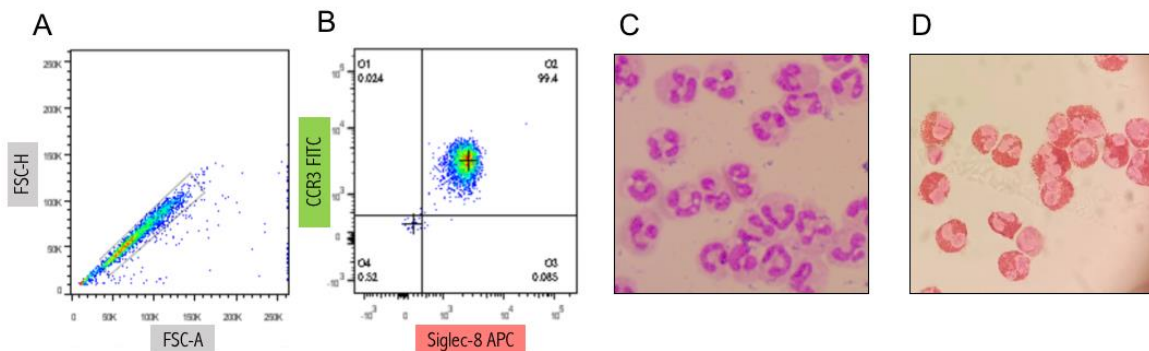


Figura 8. Aislamiento de eosinófilos a partir de sangre periférica. Se aislaron eosinófilos utilizando gradiente de ficoll y microperlas magnéticas anti-CD16. Se determinaron las poblaciones celulares mediante citometría de flujo y morfología. **(A)** Selección de células individuales. **(B)** Neutrófilos (CCR3⁻ Siglec-8⁻) y eosinófilos (CCR3⁺ Siglec-8⁺). Las células fueron teñidas con Wright. **(C)** Células fijadas por la columna de separación (selección positiva de neutrófilos). **(D)** Células eluidas de la columna de separación (selección negativa de eosinófilos).

6.2 Determinación de SA en eosinófilos

Debido a la capacidad del IAV de entrar a las células diana mediante su unión a residuos de ácido siálico presentes en las superficies celulares de los mamíferos, determinamos la expresión de SA α 2,6 y SA α 2,3 en la superficie celular de eosinófilos humanos utilizando lectinas específicas. Está reportado que las líneas celulares MDCK y A549 presentan SA α 2,6 y SA α 2,3 en sus membranas (100), por lo que utilizamos éstas células como controles positivos (**Figura 9C-F, Figura 9I-J**). Los resultados mostraron que los eosinófilos humanos presentaron SA α 2,6 y SA α 2,3 en sus membranas, esto determinado por microscopía de fluorescencia (**Figura 9A-B,G**) y confirmado por citometría de flujo (**Figura 9H**).

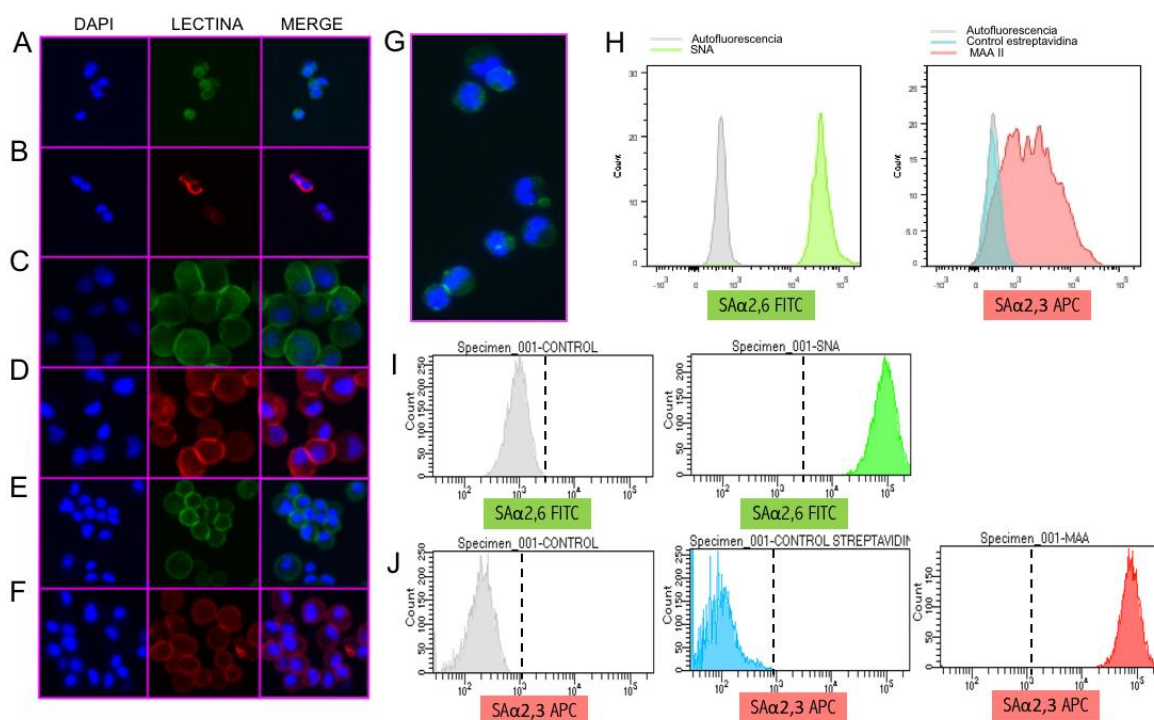


Figura 9. Expresión de SA en eosinófilos humanos. Se midió la expresión de SAα2,6 y SAα2,3 en eosinófilos, células A549 y MDCK por fluorescencia y citometría de flujo. Expresión de receptores SAα2,6 (paneles **A**, **G**) y SAα2,3 (panel **B**) en eosinófilos. Expresión de receptores SAα2,6 (panel **C**) y SAα2,3 (panel **D**) en células A549. Expresión de receptores SAα2,6 (panel **E**) y SAα2,3 (panel **F**) en células MDCK. Determinación de SA en eosinófilos (**panel H**) y células MDCK (**paneles I y J**) por citometría de flujo. SA: Ácido siálico.

6.3 Propagación y semi-purificación de IAV

El virus de la influenza utilizado en este estudio fue propagado en células MDCK por 48 h. A este tiempo, >90% de las células infectadas presentaron efecto citopático (**Figura 10**).

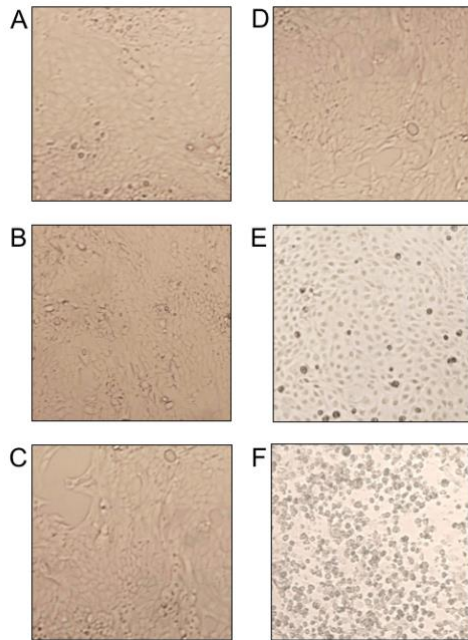


Figura 10. Efecto citopático ocasionado por IAV en células MDCK. Se infectaron células MDCK con IAV o se trataron con el eluyente (control) y se observó la morfología celular a través del tiempo. Células control a las 0 h (**A**), 24 h (**B**), y 48 h (**C**). Células infectadas con IAV a las 0 h (**D**), 24 h (**E**), y 48 h (**F**) post-infección.

Después de recuperar el sobrenadante de las células infectadas, el virus fue concentrado y semi-purificado utilizando centricones mediante centrifugación. Posteriormente se evaluó la presencia del virus mediante PCR (**Figura 11**) y se confirmó que mantuviera su infectividad (**Figura 12**).

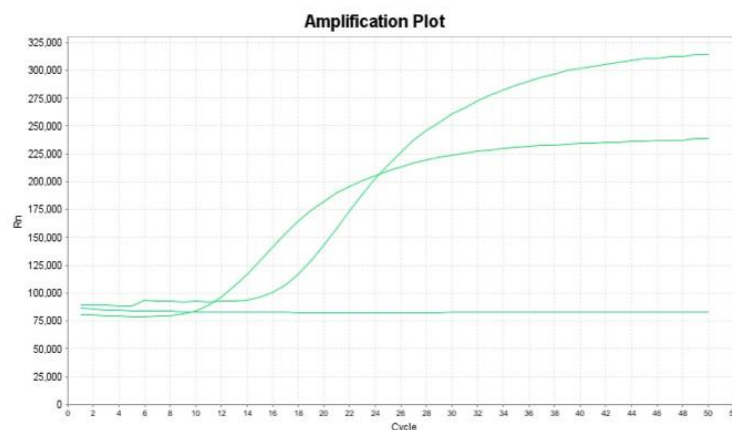


Figura 11. Presencia de IAV en las muestras concentradas y semi-purificadas. Se realizó una RT-qPCR donde se demuestra la presencia del RNA viral en las muestras.

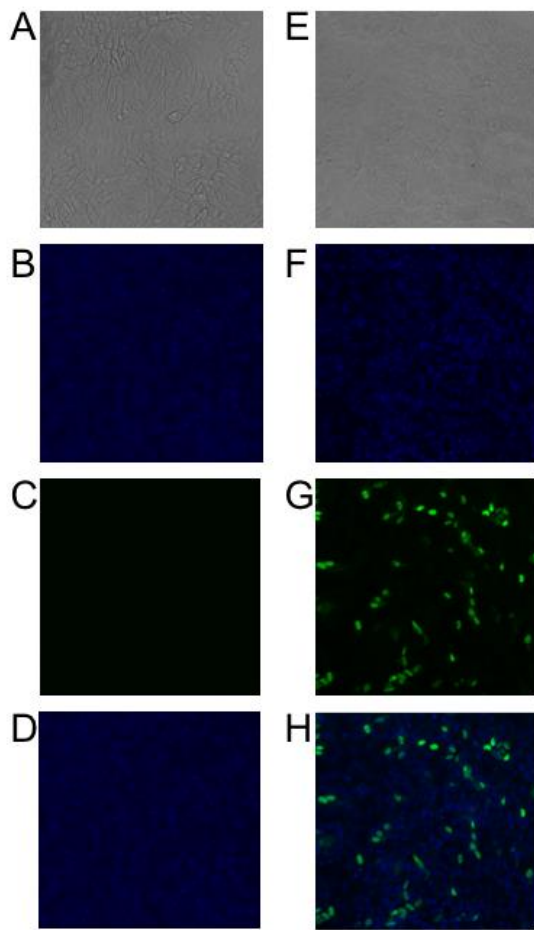


Figura 12. El virus concentrado y semi-purificado mantuvo su capacidad infecciosa. Las células MDCK sin infectar (**A-D**) y las células infectadas con IAV concentrado y semipurificado (**E-H**) se tiñeron con DAPI y con anticuerpos anti-NP. Luz blanca (**A,E**), núcleos teñidos con DAPI (**B,F**), tinción con anticuerpos anti-NP (**C,G**). Merge (**D,H**).

6.4 Titulación del virus

Está reportado que los eosinófilos humanos son capaces de reducir la infectividad viral (77). Debido a esto, quisimos evaluar si los eosinófilos humanos presentaban actividad antiviral contra IAV, por lo que incubamos los eosinófilos con IAV (MOI 1) por 24 h y posteriormente determinamos el título viral del sobrenadante utilizando la técnica TCID₅₀ en células MDCK. Se observó que los eosinófilos disminuyeron de manera drástica el título viral, aproximadamente dos logaritmos (**Figura 13**).

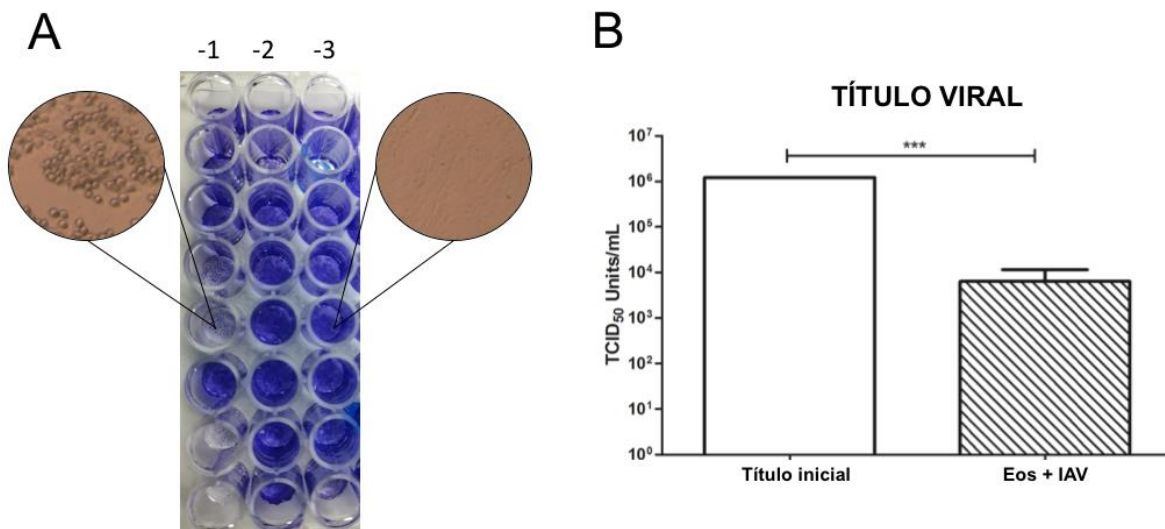


Figura 13. Los eosinófilos humanos reducen el título viral. Los eosinófilos aislados fueron expuestos a IAV por 24 h en cultivo. **(A)** Fotografías representativas del efecto citopático ocasionado por el sobrenadante de eosinófilos expuestos a IAV en células MDCK en la titulación del virus. **(B)** El título inicial de IAV y el título de los sobrenadantes de eosinófilos expuestos a IAV (Eos+IAV) fueron determinados con la técnica TCID₅₀. Los datos se presentan como promedio y desviación estándar (DS); n=3. La comparación estadística se realizó con la prueba t de Student (***) $P < 0.001$. Eos: eosinófilos; IAV: Virus de la influenza A.

Para descartar la posibilidad de que la disminución del título viral se debiera al efecto lítico del virus sobre las células, se realizaron los ensayos de viabilidad a las 24 h. La viabilidad de los eosinófilos sin infección (control) fue de 65.9% (**Figura 14A**). Por otra parte, los eosinófilos con IAV presentaron una viabilidad del 92.3% (**Figura 14B**), lo cual sugiere que las células están siendo activadas por IAV. Utilizamos como control positivo de viabilidad eosinófilos incubados con R848 (**Figura 14C**), un ligando sintético de TLR7 y TLR8, obteniendo una viabilidad del 78.3%. Como control de muerte celular se utilizó DMSO al 10%, que redujo la viabilidad celular al 3.2% (**Figura 14D**).

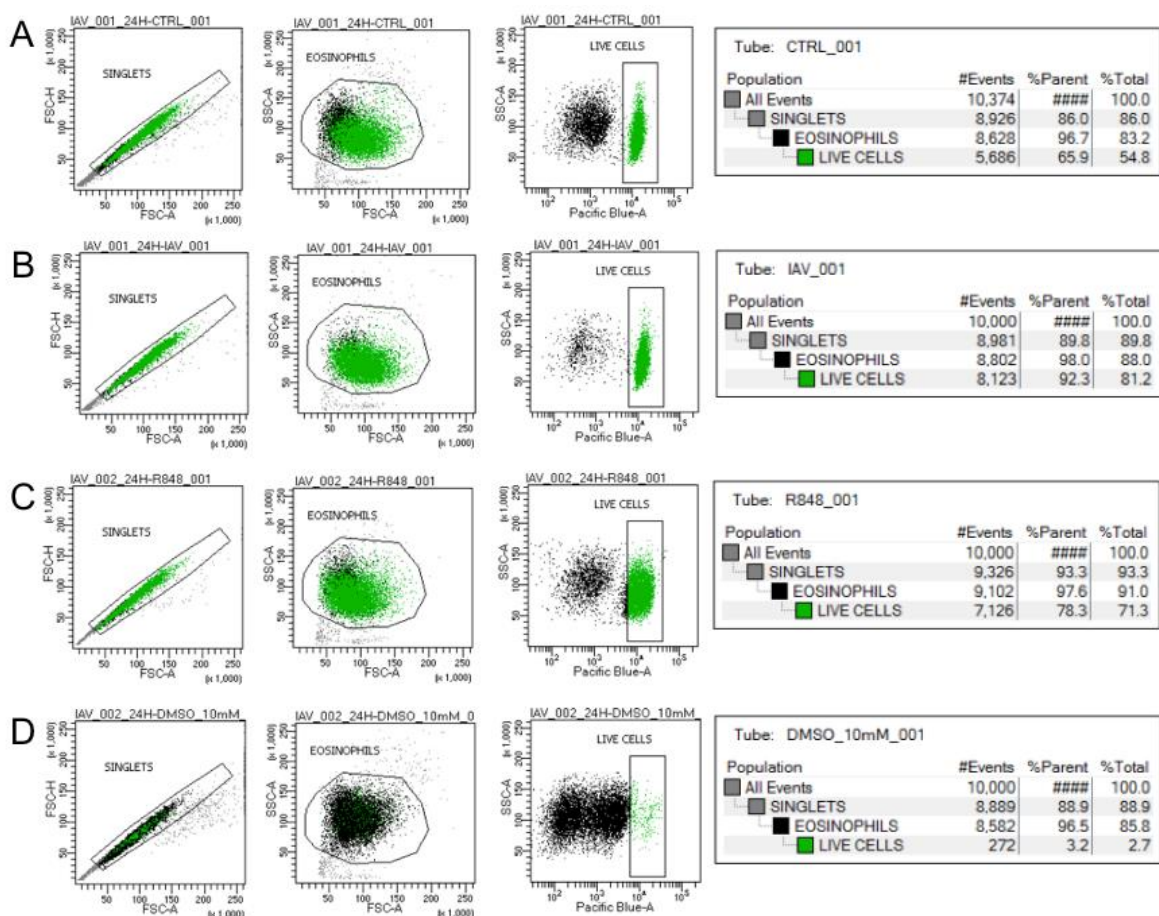


Figura 14. Los eosinófilos expuestos a IAV mantienen la viabilidad celular. Se evaluó la viabilidad celular mediante el colorante vital Calcein Blue AM por citometría de flujo a las 24h en **(A)** eosinófilos sin IAV, **(B)** eosinófilos con IAV, **(C)** eosinófilos incubados con R848 10 μ M y **(D)** eosinófilos expuestos a DMSO al 10%.

6.5 Expresión de TLR3, TLR7, DDX58, IFNB1 e IFNL1

Los eosinófilos expresan una gran cantidad de PRRs, incluyendo receptores que reconocen virus. Debido a que los eosinófilos de ratón incrementan algunos PRRs después de la infección con IAV (101), evaluamos si los eosinófilos humanos presentan un comportamiento similar. Los eosinófilos incrementaron la expresión génica de DDX58 (RIG-I) después de la infección con IAV (MOI 0.1) y el incremento fue estadísticamente significativo utilizando una dosis más alta (MOI 1) (**Figura 16C**).

Sin embargo, la infección con IAV no incrementó la expresión de TLR3 ni TLR7 (**Figura 16A-B**).

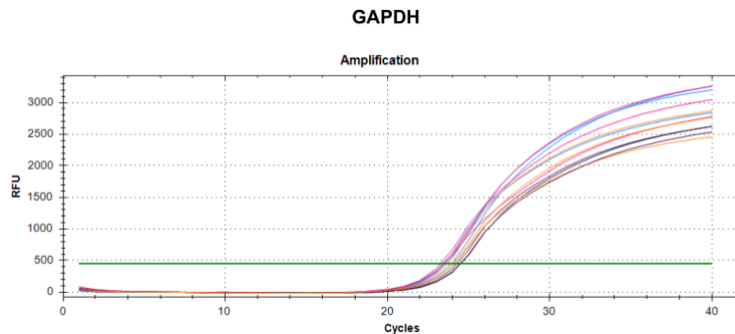


Figura 15. Las muestras de cDNA de eosinófilos amplificaron para el gen endógeno GAPDH. Se extrajo el RNA total de eosinófilos bajo las diferentes condiciones; se obtuvo el cDNA y se realizó RT-qPCR para GAPDH, utilizado como gen endógeno.

Parte de la respuesta antiviral consiste en la producción de interferones de tipo I y III. Nosotros evaluamos si la exposición con IAV inducía un incremento en la expresión génica de IFN- β e IFN- λ . La infección con IAV no aumentó la expresión de IFN- β (**Figura 16D**). Por otra parte, no se encontró expresión de IFN- λ en los eosinófilos de sangre periférica (**Figura 17**).

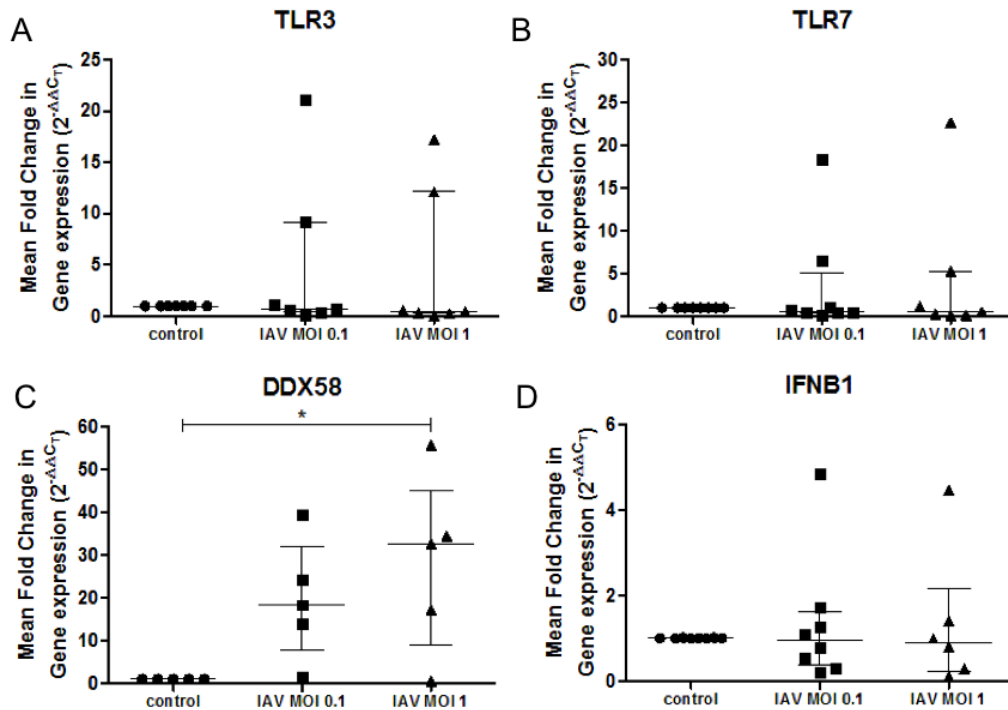


Figura 16. Los eosinófilos humanos regulan positivamente la expresión de RIG-I después de la incubación con IAV. Los eosinófilos aislados fueron estimulados con IAV (MOI 0.1 ó MOI 1) por 24 h seguidos de extracción de RNA y RT-qPCR. Los datos están presentados como promedio y error estándar de la media (SEM); n=5-8 donadores/grupo. La comparación estadística se realizó con ANOVA de una vía y post-prueba de Bonferroni (* $P < 0.05$).

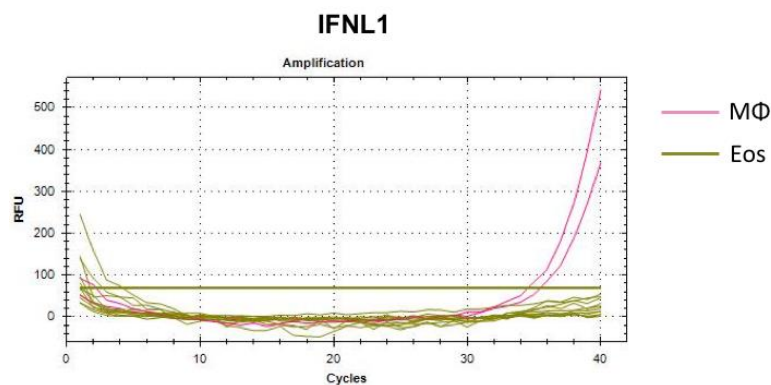


Figura 17. Los eosinófilos humanos de sangre periférica no expresan IFNL1. Se realizó una RT-qPCR para IFNL1 a partir de cDNA de eosinófilos (verde) y macrófagos THP-1 (rosa) expuestos a IAV (MOI 1). Eos: eosinófilos; MΦ: Macrófagos.

6.6 Cuantificación de IL-8, IL-6 e IFN- γ

Los eosinófilos responden a la infección viral mediante la secreción de citocinas. Debido a que los ligandos de TLR7 activan a los eosinófilos e inducen la secreción de IL-8 (102), utilizamos R848 como un control positivo. Como se esperaba, los eosinófilos estimulados con R848 secretaron IL-8. De manera interesante, los eosinófilos expuestos a IAV también secretaron IL-8 (**Figura 18A**). Contrariamente, cuando evaluamos la secreción de IL-6 e IFN- γ en los sobrenadantes de cultivo de eosinófilos incubados con IAV no encontramos expresión de estas citocinas (**Figura 18B**).

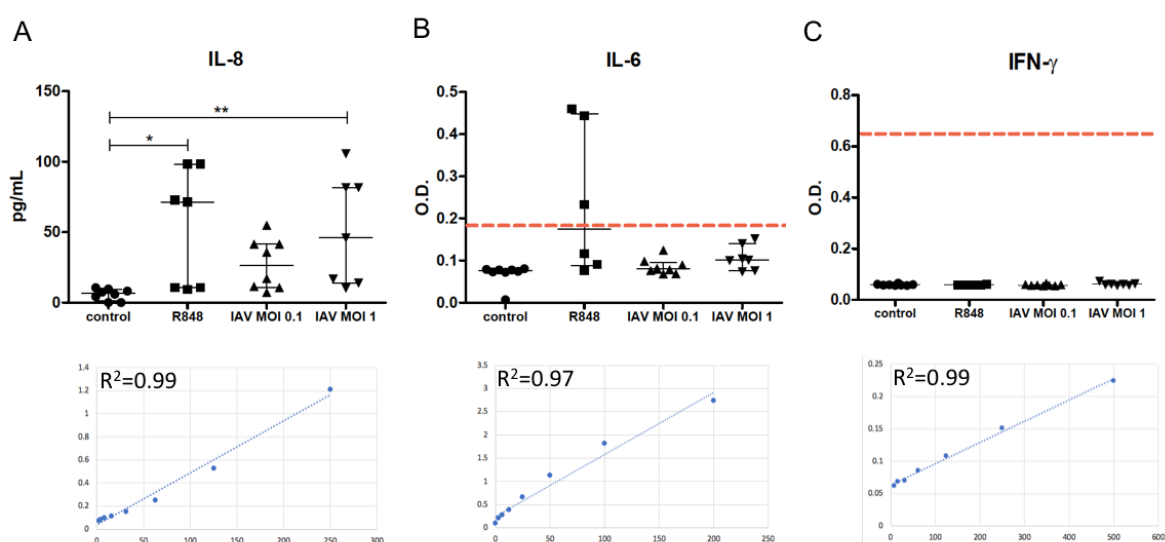


Figura 18. Los eosinófilos humanos secretan IL-8 en respuesta a IAV. Los eosinófilos aislados fueron estimulados con R848 (10 μ M), IAV-MOI 0.1 e IAV- MOI 1 para después cuantificar los niveles de IL-8 (**panel A**), IL-6 (**panel B**) e IFN- γ (**panel C**) por el método de ELISA. Los datos están representados como mediana e IQR; n=7-8 donadores/grupo. La comparación estadística se realizó con la prueba Kruskal-Wallis y post-prueba de Dunn (* P <0.05, ** P <0.01). En el panel inferior se muestran las curvas estándar para cada una de las citocinas analizadas

7. DISCUSIÓN

IAV infecta a las células diana utilizando la HA, la cual se une a residuos de SA. Los virus de influenza que infectan humanos se unen de manera preferente a SA α 2,6; mientras que los virus de influenza que infectan aves utilizan el receptor SA α 2,3 (90). De manera interesante, se ha reportado que los neutrófilos humanos no expresan SA α 2,6 ni SA α 2,3, pero son susceptibles a la infección por IAV, sugiriendo otras formas de entrada (103). Se ha demostrado que los eosinófilos de ratón son susceptibles a la infección por IAV (66) pero se desconoce si este proceso ocurre en los eosinófilos humanos. En este trabajo demostramos que los eosinófilos humanos presentan SA α 2,6 y SA α 2,3 en la membrana celular, por lo tanto, es probable que los eosinófilos humanos sean susceptibles a la infección por IAV. De manera contrastante, se ha sugerido recientemente que IAV se une solamente a la membrana de eosinófilos humanos en lugar de infectarlos (85). Son necesarios más estudios para evaluar la susceptibilidad de eosinófilos humanos a la infección por IAV.

En nuestro trabajo, cuando los eosinófilos fueron expuestos a IAV por 24 h, el título viral disminuyó dramáticamente, lo cual sugiere que la infectividad de IAV disminuyó después del contacto con los eosinófilos. Resultados similares se han observado con PIV (77) y RSV (85). Recientemente se demostró que los eosinófilos de ratón poseen actividad antiviral contra IAV (101). Esta actividad es debida a la combinación de EDN y ECP, proteínas con actividad de ribonucleasas (104). Es posible que mecanismos similares puedan estar ocurriendo en eosinófilos humanos.

Por otra parte, es probable que la infección por IAV que se lleva a cabo en eosinófilos humanos sea abortiva para la replicación viral, como se ha sugerido en eosinófilos de ratones (66). Las infecciones abortivas de IAV también se han observado en otros tipos celulares, incluyendo en neutrófilos (105). Además, la infección abortiva también se ha reportado en eosinófilos humanos para PIV (77).

Para descartar la posibilidad de que el título viral disminuyera debido al efecto de IAV sobre los eosinófilos, se realizaron ensayos de viabilidad celular hasta las 24 h. Con estos ensayos, se demostró que la disminución de la infectividad viral no es debido a un decremento de la viabilidad de los eosinófilos; al contrario, IAV mantiene la viabilidad celular en porcentajes elevados comparados con los controles. Es probable que este mantenimiento de la viabilidad sea debido a la activación del eosinófilo a través del TLR7. El TLR7 es el PRR que más se expresa en eosinófilos humanos (27). Estas células responden a través de la señalización por TLR7 incrementando la sobrevivencia celular y la expresión del marcador de activación CD11b, así como la liberación de superóxido (34).

La activación celular iniciada por TLR7 en eosinófilos humanos también induce la producción de IL-8 (102). En nuestro trabajo, los eosinófilos respondieron a R848, un ligando de TLR7 y TLR8, secretando esta citocina. De manera similar, los eosinófilos humanos expuestos a IAV secretaron IL-8. La IL-8 es una quimiocina potente para los neutrófilos y es secretada principalmente por células epiteliales después de la infección con IAV (106). A pesar de que los eosinófilos normalmente no expresan el receptor para esta quimiocina (107), los eosinófilos activados de

donadores atópicos responden a las señales quimiotácticas de IL-8 (108). En un escenario asmático, los eosinófilos podrían responder a IAV secretando IL-8 y reclutando incluso más eosinófilos al sitio de infección.

Otra citocina evaluada fue la citocina proinflamatoria IL-6. Se ha demostrado que la IL-6 es secretada por eosinófilos de ratón después de la infección con PVM y por eosinófilos humanos después de la infección con RSV (73). Recientemente, Sabogal Piñeros y colaboradores demostraron que los eosinófilos humanos incubados con IAV también secretan IL-6 (85). Sin embargo, en nuestras condiciones experimentales, no detectamos IL-6 después de exponer a los eosinófilos con IAV. La razón podrían ser las diferencias metodológicas utilizadas en ambos estudios, incluyendo la dosis de infección, el tiempo de incubación y la cepa de IAV utilizada.

Los eosinófilos contienen en sus gránulos citocinas preformadas; entre ellas citocinas tipo 1 como IFN- γ , el cual puede ser liberado en cuestión de segundos después del estímulo adecuado (109). En nuestro estudio, los eosinófilos expuestos a IAV no secretaron IFN- γ . Nuestros resultados son comparables con un reporte previo donde se evaluó la respuesta de eosinófilos contra PVM y no se encontró secreción de esta citocina (73). Sin embargo, los eosinófilos de ratón incubados con péptidos de IAV inducen la producción de IFN- γ por células T CD8⁺ específicas para IAV, lo cual sugiere la participación de los eosinófilos en las respuestas celulares (66). El IFN- γ secretado por los linfocitos T CD8⁺ podría activar más a los eosinófilos para responder a la infección por IAV, ya que el IFN- γ incrementa la expresión del

TLR7 y el TLR8 en eosinófilos humanos (34,77). Esto potencializaría la producción de NO inducido por TLR7 en eosinófilos (77), molécula con actividad antiviral contra virus como IAV (48) y PIV (77).

Nosotros demostramos que los eosinófilos humanos incubados con IAV sobre-expresan el mRNA de RIG-I, un descubrimiento reportado solo en eosinófilos de ratón (110). RIG-I induce una respuesta antiviral contra virus de RNA, como IAV (111,112). Su activación induce la producción de IFN de tipos I y III, así como de citocinas inflamatorias (95) y se ha propuesto como el principal PRR que reconoce a IAV (112). Si la sobre-expresión de RIG-I en eosinófilos tiene una significancia biológica o no debe ser investigado, ya que la estimulación de este receptor por ligandos sintéticos no parece activar a los eosinófilos (35).

También evaluamos la expresión de otros PRRs involucrados en el reconocimiento viral, como TLR3 y TLR7. Los eosinófilos humanos expresaron en nuestros estudios de manera constitutiva ambos receptores como se ha reportado previamente (30,34). Sin embargo, después de la exposición con IAV no incrementaron su expresión. A pesar de esto, su expresión en eosinófilos sugiere participación en las infecciones virales, como se ha demostrado para otros virus respiratorios (77,113).

Los IFNs de tipos I y III son importantes durante la respuesta antiviral (52). Teniendo esto en mente decidimos evaluar la expresión de los genes IFNB1 (IFN- β) e IFNL1 (IFN- λ). Contrario a lo reportado para eosinófilos intestinales y de la línea celular EoL-1 (114), los eosinófilos de sangre periférica no expresaron IFNL1. Por otra parte,

IFNB1 no fue sobre-expresado después de la exposición con IAV. De manera similar, en un estudio previo de eosinófilos en respuesta a PVM, no se indujo la secreción de IFN- β (73). Estos resultados, sugieren que el papel antiviral de los eosinófilos no está mediado por IFNs. Esto podría estar relacionado con la producción disminuida de IFN- β e IFN- λ por células epiteliales bronquiales después del co-cultivo con eosinófilos (115). Además, hay muchas observaciones en las que pacientes asmáticos presentan fallas en las respuestas de inmunidad innata contra virus respiratorios por una reducción en la producción de IFNs del tipo I y III (116).

Los eosinófilos de pacientes asmáticos poseen un fenotipo activado (117). Se ha reportado que los eosinófilos humanos de pacientes alérgicos responden de manera más intensa cuando son activados por ligandos sintéticos de TLR7 y TLR9 (102). Con estos resultados en mente, es razonable hipotetizar que los eosinófilos de pacientes alérgicos responderán de manera más intensa al estímulo con IAV. Esto va relacionado con múltiples estudios realizados en modelos de alergia en ratones donde se ha reportado que los eosinófilos poseen propiedades antivirales (66,79,113). Sin embargo, también se ha documentado que los eosinófilos de pacientes asmáticos tienen una capacidad reducida para unirse a IAV y RSV en comparación con sujetos sanos (85). Se necesitan estudios adicionales para evaluar si los eosinófilos de pacientes alérgicos poseen una capacidad antiviral más débil o más fuerte. Además, se ha reportado que la actividad antiviral de los eosinófilos contra IAV es diferente dependiendo del sitio de infección. En un modelo de rinitis alérgica, la presencia o ausencia de eosinófilos fue irrelevante para eliminar

el virus (118). En contraste, en un modelo de asma alérgica, los eosinófilos incrementaron la respuesta antiviral resultando en protección frente a IAV (66).

Recientemente, se describió una población diferente de eosinófilos en pulmones, que está presente tanto en ratones como humanos. Dicha población, conocida como eosinófilos residentes de pulmón, difieren fenotípica y funcionalmente de los eosinófilos tradicionales, siendo capaces de inhibir las respuestas tipo 2 contra alérgenos inhalados (28). A la fecha, no se ha descrito si esta población celular presenta actividad antiviral contra virus respiratorios, lo cual sería relevante debido a la localización anatómica.

En diciembre del 2019 surgió una nueva pandemia derivada de la enfermedad ocasionada por el virus SARS-CoV-2 (119). Recientemente se ha descrito que los pacientes asmáticos presentan un riesgo reducido de presentar complicaciones asociadas a la infección por SARS-CoV-2. Existen reportes que asocian la presencia de eosinofilia, tanto en pacientes asmáticos o en personas sanas, con una reducción del riesgo de mortalidad ocasionada por el virus (120). Múltiples grupos de investigación han propuesto la eosinopenia como un marcador pronóstico de la enfermedad, donde la eosinopenia está relacionada a un mayor riesgo de enfermedad grave (121–123). A la fecha, la participación de los eosinófilos en la patología de la enfermedad se desconoce. Sin embargo, al ser SARS-CoV-2 un virus de ssRNA (119), al igual que IAV, existe la probabilidad de la participación de los eosinófilos en la respuesta antiviral.

A pesar de que existen estudios que demuestran claramente las propiedades antivirales de los eosinófilos (26), aún se desconoce si los eosinófilos son necesarios durante las infecciones virales en humanos y su significancia clínica. Los eosinófilos están involucrados en patologías alérgicas y no alérgicas como el asma eosinofílica y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD). La relación entre los virus respiratorios y estas enfermedades no está entendida completamente. Los pacientes con asma y COPD con números elevados de eosinófilos en sangre presentan un riesgo incrementado de complicaciones (124,125). De hecho, específicamente los pacientes con asma eosinofílica presentan un riesgo mayor a exacerbaciones inducidas por virus (126). Se han implementado tratamientos para estos pacientes, como anticuerpos monoclonales anti-IL-5, anti-IL-4 y anti-IgE con buenos resultados (116). Sin embargo, recientemente se ha observado que pacientes infectados con HRV tratados con anticuerpos anti-IL-5 presentan una carga viral aumentada comparada con el grupo placebo, lo cual sugiere un papel antiviral de los eosinófilos (76). Como fue sugerido por Rosenberg y colaboradores (127), es posible que los eosinófilos promuevan respuestas antivirales contra virus respiratorios durante escenarios específicos. Sin embargo, pueden causar una respuesta exagerada al tratar de eliminar al virus. Son necesarios más estudios para entender completamente la relación entre los eosinófilos y los virus respiratorios durante condiciones específicas, como el asma, lo cual puede a su vez traernos un mejor conocimiento sobre la biología del eosinófilo.

8. CONCLUSIÓN

Los eosinófilos humanos expresan ácido siálico, sugiriendo un ligando potencial para la entrada de IAV. Estas células son capaces de reducir de manera drástica la infectividad del virus. Los eosinófilos expuestos a IAV inducen la secreción de IL-8 y el incremento de la expresión de RIG-I. Estos resultados sugieren la importancia de los eosinófilos en la infección con IAV, lo cual podría ser relevante en condiciones como el asma eosinofílica.

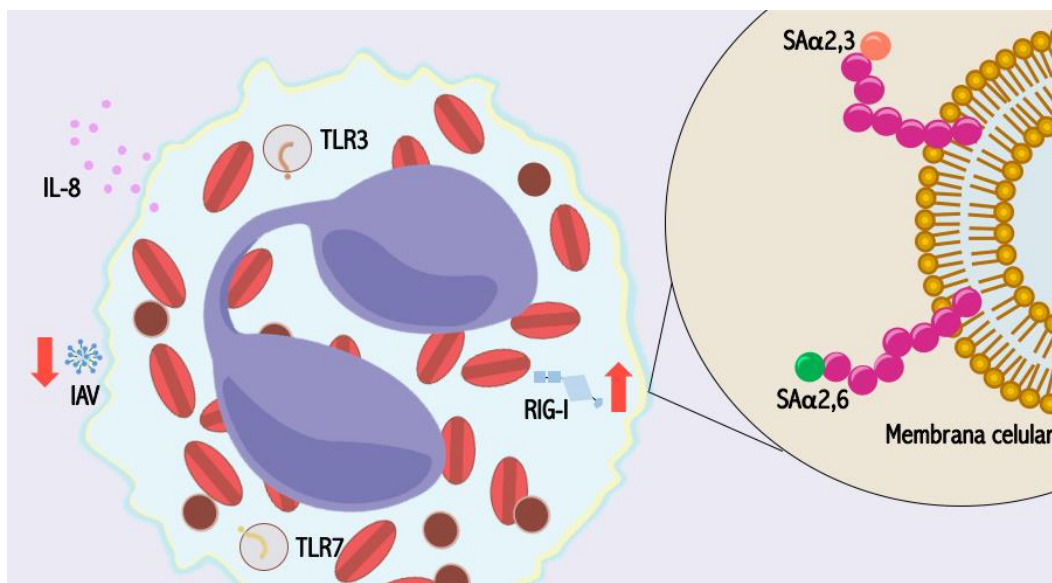


Figura 19. Conclusión gráfica.

9. PERSPECTIVAS

1. Evaluar la actividad de RNasas de ECP y EDN de eosinófilos humanos contra IAV.
2. Estudiar la participación de RIG-I en eosinófilos humanos en la infección por IAV.
3. Evaluar la actividad antiviral de eosinófilos contra otros virus respiratorios, como el SARS-COV2.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Metcalf D, Burgess AW, Johnson GR, Nicola NA, Nice EC, Delamarter J, et al. In vitro actions on hemopoietic cells of recombinant murine GM-CSF purified after production in *Escherichia coli*: Comparison with purified native GM-CSF. *J Cell Physiol.* 1986; 128:421-431.
2. Campbell HD, Tucker WQ, Hort Y, Martinson ME, Mayo G, Clutterbuck EJ, et al. Molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of the gene encoding human eosinophil differentiation factor (interleukin 5). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987;84(19):6629-33.
3. Lopez AF, Warren DJ, Vadas MA, Sanderson CJ. Murine Eosinophil Differentiation Factor An Eosinophil-specific Colony-stimulating Factor with Activity for Human Cells. *J Exp Med.* 1986;163(May):1085-99.
4. Sanderson CJ. Interleukin-5, Eosinophils, and Disease. *Blood.* 1992; 79(12):3101-9.
5. Steinbach KH, Schick P, Trepel F, Raffler H, Döhrmann J, Heilgeist G, et al. Estimation of kinetic parameters of neutrophilic, eosinophilic, and basophilic granulocytes in human blood. *Blut.* 1979; 39(1):27-38.
6. Kovalszki A, Weller PF. Eosinophilia. Primary Care - Clinics in Office Practice. 2016; 43(4):607-617.
7. Lee JJ, Jacobsen EA, McGarry MP, Schleimer RP, Lee NA. Eosinophils in health and disease: The LIAR hypothesis. *Clinical and Experimental Allergy.* 2010; 40(4):563-75.
8. Mishra A, Hogan SP, Lee JJ, Foster PS, Rothenberg ME. Fundamental signals that regulate eosinophil homing to the gastrointestinal tract. *J Clin Invest.* 1999; 103(12):1719-27.
9. Weller PF, Spencer LA. Functions of tissue-resident eosinophils. *Nat Rev Immunol.* 2017; 17(12):746-760.
10. Rothenberg ME, Hogan SP. The eosinophil. *Annu Rev Immunol.* 2006; 24:147-74.
11. Spencer LA, Szela CT, Perez SAC, Kirchhoffer CL, Neves JS, Radke AL, et al. Human eosinophils constitutively express multiple Th1, Th2, and immunoregulatory cytokines that are secreted rapidly and differentially. *J Leukoc Biol.* 2008;85(1):117-23.
12. McGarry MP. The Evolutionary Origins and Presence of Eosinophils in Extant Species. *Eosinophils Heal Dis.* 2013;13-8.
13. Buys J, Wever R, van Stigt R, Ruitenber EJ. The killing of newborn larvae of *Trichinella spiralis* by eosinophil peroxidase in vitro. *Eur J Immunol.* 1981; 11(10):843-5.
14. Venturiello SM, Giambartolomei GH, Costatino SN. Immune cytotoxic activity of human eosinophils against *Trichinella spiralis* newborn larvae. *Parasite Immunol.* 1995; 17(11):555-9.
15. Huang L, Gebreselassie NG, Gagliardo LF, Ruyechan MC, Luber KL, Lee NA, et al. Eosinophils Mediate Protective Immunity against Secondary Nematode Infection. *J Immunol.* 2015; 194(1):283-290.
16. Knott ML, Matthaei KI, Giacomini PR, Wang H, Foster PS, Dent LA. Impaired resistance in early secondary *Nippostrongylus brasiliensis* infections in mice with defective eosinophilopoiesis. *Int J Parasitol.* 2007; 37(12):1367-78.
17. Swartz JM, Dyer KD, Cheever AW, Ramalingam T, Pesnicak L, Domachowske JB,

- et al. *Schistosoma mansoni* infection in eosinophil lineage-ablated mice. *Blood*. 2006;108(7):2420–7.
18. O’Connell AE, Hess JA, Santiago GA, Nolan TJ, Lok JB, Lee JJ, et al. Major basic protein from eosinophils and myeloperoxidase from neutrophils are required for protective immunity to *Strongyloides stercoralis* in mice. *Infect Immun*. 2011;79(7):2770–8.
 19. Fabre V, Beiting DP, Bliss SK, Gebreselassie NG, Gagliardo LF, Lee N a., et al. Eosinophil Deficiency Compromises Parasite Survival in Chronic Nematode Infection. *J Immunol*. 2009; 1;182(3):1577-83.
 20. Gebreselassie NG, Moorhead AR, Fabre V, Gagliardo LF, Lee NA, Lee JJ, et al. Eosinophils Preserve Parasitic Nematode Larvae by Regulating Local Immunity. *J Immunol*. 2012;188(1):417–25.
 21. Simon D, Wardlaw A, Rothenberg ME. Organ-specific eosinophilic disorders of the skin, lung, and gastrointestinal tract. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2010; 126(1):3-13.
 22. Wu D, Molofsky AB, Liang HE, Ricardo-Gonzalez RR, Jouihan HA, Bando JK, et al. Eosinophils sustain adipose alternatively activated macrophages associated with glucose homeostasis. *Science*. 2011; 332(6026):243-7.
 23. Arbach O, Chu VT, Beller A, Rausch S, Strandmark J, Za M, et al. Article Eosinophils Promote Generation and Maintenance of Immunoglobulin-A-Expressing Plasma Cells and Contribute to Gut Immune Homeostasis. 2014; 40(4):582-93.
 24. Davis BP, Rothenberg ME. Eosinophils and cancer. *Cancer Immunol Res*. 2014;2(1):1–8.
 25. Ravin KA, Loy M. The eosinophil in infection. *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*. 2016; 50(2):214-27.
 26. Flores-Torres AS, Salinas-Carmona MC, Salinas E, Rosas-Taraco AG. Eosinophils and Respiratory Viruses. *Viral Immunol*. 2019;32(5):198–207.
 27. Kvarnhammar AM, Cardell LO. Pattern-recognition receptors in human eosinophils. *Immunology*. 2012;136(1):11–20.
 28. Mesnil C, Raulier S, Paulissen G, Xiao X, Birrell MA, Pirottin D, et al. Lung-resident eosinophils represent a distinct regulatory eosinophil subset. 2016;126(9):3279–95.
 29. Amin K, Janson C, Bystrom J. Role of Eosinophil Granulocytes in Allergic Airway Inflammation Endotypes. *Scandinavian Journal of Immunology*. 2016; 84(2):75-85.
 30. Mnsson A, Fransson M, Adner M, Benson M, Uddman R, Björnsson S, et al. TLR3 in human eosinophils: Functional effects and decreased expression during allergic rhinitis. *Int Arch Allergy Immunol*. 2010;151(2):118–28.
 31. Phipps S, Lam CE, Mahalingam S, Newhouse M, Ramirez R, Rosenberg HF, et al. Eosinophils contribute to innate antiviral immunity and promote clearance of respiratory syncytial virus. *Blood*. 2007;110(5):1578–86.
 32. Wong CK, Cheung PFY, Ip WK, Lam CWK. Intracellular signaling mechanisms regulating toll-like receptor-mediated activation of eosinophils. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2007; 37(1):85-96.
 33. S.S. Diebold H. Hemmi, S. Akira, C. Reis e Sousa TK. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science*. 2004;303 1529-1.
 34. Nagase H, Okugawa S, Ota Y, Yamaguchi M, Tomizawa H, Matsushima K, et al.

- Expression and Function of Toll-Like Receptors in Eosinophils: Activation by Toll-Like Receptor 7 Ligand. *J Immunol.* 2003;171(8):3977–82.
35. Kvarnhammar AM, Petterson T, Cardell LO. NOD-like receptors and RIG-I-like receptors in human eosinophils: Activation by NOD1 and NOD2 agonists. *Immunology.* 2011;134(3):314–25.
 36. Loo YM, Gale M. Immune Signaling by RIG-I-like Receptors. *Immunity.* 2011; 34(5):680-92.
 37. Barral PM, Sarkar D, Su Z zhong, Barber GN, DeSalle R, Racaniello VR, et al. Functions of the cytoplasmic RNA sensors RIG-I and MDA-5: Key regulators of innate immunity. *Pharmacol Ther.* 2009;124(2):219–34.
 38. Bystrom J, Amin K, Bishop-Bailey D. Analysing the eosinophil cationic protein - a clue to the function of the eosinophil granulocyte. *Respir Res.* 2011;12(1):10.
 39. Lehrer RI, Szklarek D, Barton A, Ganz T, Hamann KJ, Gleich GJ. Antibacterial properties of eosinophil major basic protein and eosinophil cationic protein. *J Immunol.* 1989;142(12):4428–34.
 40. Hamann KJ, Gleich GJ, Checkel JL, Loegering DA, McCall JW, Barker RL. In vitro killing of microfilariae of *Brugia pahangi* and *Brugia malayi* by eosinophil granule proteins. *J Immunol.* 1990; 144(8):3166-73.
 41. Gleich GJ, Loegering D a, Bell MP, Checkel JL, Ackerman SJ, McKean DJ. Biochemical and functional similarities between human eosinophil-derived neurotoxin and eosinophil cationic protein: homology with ribonuclease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986; 83(10):3146-3150.
 42. Rosenberg HF, Domachowske JB. Eosinophils, eosinophil ribonucleases, and their role in host defense against respiratory virus pathogens. *J Leukoc Biol.* 2001;70(5):691–8.
 43. Slifman NR, Loegering D a, McKean DJ, Gleich GJ. Ribonuclease activity associated with human eosinophil-derived neurotoxin and eosinophil cationic protein. *J Immunol.* 1986; 137(9):2913-7.
 44. Acharya KR, Ackerman SJ. Eosinophil granule proteins: Form and function. *J Biol Chem.* 2014;289(25):17406–15.
 45. Weiss SJ, Test ST, Eckmann CM, Roos D, Regiani S. Brominating oxidants generated by human eosinophils. *Science.* 1986; 234(4773):200-203.
 46. del Pozo V, de Arruda-Chaves E, de Andrés B, Cárdaña B, López-Farré A, Gallardo S, et al. Eosinophils transcribe and translate messenger RNA for inducible nitric oxide synthase. *J Immunol.* 1997; 158(2):859-864.
 47. Abdul-Cader MS, Amarasinghe A, Abdul-Careem MF. Activation of toll-like receptor signaling pathways leading to nitric oxide-mediated antiviral responses. *Archives of Virology.* 2016; 161(8):2075-86.
 48. Rimmelzwaan GF, Baars M, Fouchier RAM, Osterhaus ADME. Inhibition of influenza virus replication by nitric oxide. *J Virol.* 1999; 73(10):8880-3.
 49. Shamri R, Xenakis JJ, Spencer LA. Eosinophils in innate immunity: An evolving story. *Cell and Tissue Research.* 2011; 343(1):57-83.
 50. Davoine F, Lacy P. Eosinophil cytokines, chemokines, and growth factors: Emerging roles in immunity. *Frontiers in Immunology.* 2014; 5:570.
 51. Komastu T, Ireland DDC, Reiss CS. IL-12 and Viral Infections. *Cytokine Growth Factor Rev.* 1998;9(3):277–85.
 52. Sen GC. Viruses and Interferons. *Annu Rev Microbiol.* 2001; 55:255-81.

53. Yousefi S, Gold JA, Andina N, Lee JJ, Kelly AM, Kozlowski E, et al. Catapult-like release of mitochondrial DNA by eosinophils contributes to antibacterial defense. *Nat Med*. 2008; 14(9):949-53.
54. Muniz VS, Silva JC, Braga YAV, Melo RCN, Ueki S, Takeda M, et al. Eosinophils release extracellular DNA traps in response to *Aspergillus fumigatus*. *J Allergy Clin Immunol*. 2018;141(2):571-585.
55. Schönrich G, Raftery MJ. Neutrophil extracellular traps go viral. *Frontiers in Immunology*. 2016; 7:366.
56. Silveira JS, Antunes GL, Gassen RB, Breda RV, Stein RT, Pitrez PM, et al. Respiratory syncytial virus increases eosinophil extracellular traps in a murine model of asthma. *Asia Pac Allergy*. 2019;9(4):4–11.
57. Lucey DR, Nicholson-Weller A, Weller PF. Mature human eosinophils have the capacity to express HLA-DR. *Proc Natl Acad Sci*. 1989; 86(4):1348-51.
58. Pozo V Del, de Andrés B, Martín E, Cárdbaba B, Fernández JC, Gallardo S, et al. Eosinophil as antigen-presenting cell: activation of T cell clones and T cell hybridoma by eosinophils after antigen processing. *Eur J Immunol*. 1992; 22(7):1919-25.
59. Wang H-B, Ghiran I, Matthaei K, Weller PF. Airway Eosinophils: Allergic Inflammation Recruited Professional Antigen-Presenting Cells. *J Immunol*. 2007; 179(11):7585-92.
60. Weller PF, Rand TH, Barrett T, Elovic A, Wong DT, Finberg RW. Accessory cell function of human eosinophils. HLA-DR-dependent, MHC-restricted antigen-presentation and IL-1 alpha expression. *J Immunol*. 1993; 150(6):2554-62.
61. Woerly G, Roger N, Loiseau S, Dombrowicz D, Capron A, Capron M. Expression of CD28 and CD86 by human eosinophils and role in the secretion of type 1 cytokines (interleukin 2 and interferon gamma): inhibition by immunoglobulin a complexes. *J Exp Med*. 1999; 190(4):487-95.
62. Ohkawara Y, Lim KG, Xing Z, Glibetic M, Nakano K, Dolovich J, et al. CD40 expression by human peripheral blood eosinophils. *J Clin Invest*. 1996; 97(7):1761-1766.
63. Mengelers HJ, Maikoe T, Brinkman L, Hooibrink B, Lammers JW, Koenderman L. Immunophenotyping of eosinophils recovered from blood and BAL of allergic asthmatics. *Am J Respir Crit Care Med*. 1994;149(2 Pt 1):345–51.
64. Sedgwick JB, Calhoun WJ, Vrtis RF, Bates ME, McAllister PK, Busse WW. Comparison of airway and blood eosinophil function after in vivo antigen challenge. *J Immunol*. 1992; 149(11):3710-8.
65. Hansel TT, Braunstein JB, Walker C, et al. Sputum eosinophils from asthmatics express ICAM-1 and HLA-DR. *Clin Exp Immunol*. 1991; 86(2):271-277.
66. Samarasinghe AE, Melo RC, Duan S, LeMessurier KS, Liedmann S, Surman SL, et al. Eosinophils Promote Antiviral Immunity in Mice Infected with Influenza A Virus. *J Immunol*. 2017;198(8):3214–26.
67. Handzel ZT, Busse WW, Sedgwick JB, Vrtis R, Lee WM, Kelly EA, et al. Eosinophils bind rhinovirus and activate virus-specific T cells. *J Immunol*. 1998;160(3):1279–84.
68. Padigel UM, Lee JJ, Nolan TJ, Schad GA, Abraham D. Eosinophils can function as antigen-presenting cells to induce primary and secondary immune responses to *Strongyloides stercoralis*. *Infect Immun*. 2006; 74(6):3232-3238.

69. Shi HZ, Humbles A, Gerard C, Jin Z, Weller PF. Lymph node trafficking and antigen presentation by endobronchial eosinophils. *J Clin Invest.* 2000;105(7):945–53.
70. Kim HW, Canchola JG, Brandt CD, Pyles G, Chanock RM, Jensen K, et al. Respiratory syncytial virus disease in infants despite prior administration of antigenic inactivated vaccine. *Am J Epidemiol.* 1969; 89(4):422-34.
71. Prince GA, Curtis SJ, Yim KC, Porter DD. Vaccine-enhanced respiratory syncytial virus disease in cotton rats following immunization with Lot 100 or a newly prepared reference vaccine. *J Gen Virol.* 2001; 82(Pt 12):2881-2888.
72. Borchers AT, Chang C, Gershwin ME, Gershwin LJ. Respiratory syncytial virus - A comprehensive review. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2013;45(3):331–79.
73. Dyer KD, Percopo CM, Fischer ER, Gabryszewski SJ, Rosenberg HF. Pneumoviruses infect eosinophils and elicit MyD88-dependent release of chemoattractant cytokines and interleukin-6. *Blood.* 2009; 114(13):2649-56.
74. Domachowske K. D. Dyer, A. G. Adams, T. L. Leto, H. F. Rosenberg JB. Eosinophil cationic protein/RNase 3 is another RNase A-family ribonuclease with direct antiviral activity. *Nucleic Acids Res.* 1998;26:3358-33.
75. Su Y-C, Townsend D, Herrero LJ, Zaid A, Rolph MS, Gahan ME, et al. Dual Proinflammatory and Antiviral Properties of Pulmonary Eosinophils in Respiratory Syncytial Virus Vaccine-Enhanced Disease. *J Virol.* 2015; 89(3):1564-1578.
76. Sabogal Piñeros YS, Bal SM, van de Pol MA, Dierdorp BS, Dekker T, Dijkhuis A, et al. Anti-IL-5 in Mild Asthma Alters Rhinovirus-induced Macrophage, B-Cell, and Neutrophil Responses: A Placebo-controlled, Double-Blind Study. *Am J Respir Crit Care Med.* 2019;199(4):508–17.
77. Drake MG, Bivins-smith ER, Proskocil BJ, Nie Z, Scott GD, Lee JJ, et al. Human and Mouse Eosinophils Have Antiviral Activity against Parainfluenza Virus. 2016;55:387–94.
78. Domachowske JB, Dyer KD, Bonville CA, Rosenberg HF. Recombinant Human Eosinophil-Derived Neurotoxin/RNase 2 Functions as an Effective Antiviral Agent against Respiratory Syncytial Virus. *J Infect Dis.* 1998; 177(6):1458-64.
79. Adamko B. L. Yost, G. J. Gleich, A. D. Fryer, D. B. Jacoby DJ. Ovalbumin sensitization changes the inflammatory response to subsequent parainfluenza infection eosinophils mediate airway hyperresponsiveness, m(2) muscarinic receptor dysfunction, and antiviral effects. *J Exp Med.* 1999;190:1465-78.
80. Bramley AM, Dasgupta S, Skarbinski J, Kamimoto L, Fry AM, Finelli L, et al. Intensive care unit patients with 2009 pandemic influenza A (H1N1pdm09) virus infection - United States, 2009. *Influ Other Respir Viruses.* 2012;6(6):e134-42.
81. Eriksson CO, Graham DA, Uyeki TM, Randolph AG. Risk factors for mechanical ventilation in U.S. children hospitalized with seasonal influenza and 2009 pandemic influenza A (H1N1). *Pediatr Crit Care Med.* 2012;13(6):625–31.
82. McKenna JJ, Bramley AM, Skarbinski J, Fry AM, Finelli L, Jain S. Asthma in patients hospitalized with pandemic influenza A(H1N1)pdm09 virus infection-United States, 2009. *BMC Infect Dis.* 2013; 13:57.
83. Myles P, Nguyen-Van-Tam JS, Semple MG, Brett SJ, Bannister B, Read RC, et al. Differences between asthmatics and nonasthmatics hospitalised with influenza A infection. *Eur Respir J.* 2013;41(4):824–31.
84. Nguyen-Van-Tam JS, Openshaw PJ, Hashim A, Gadd EM, Lim WS, Semple MG, et

- al. Risk factors for hospitalisation and poor outcome with pandemic A/H1N1 influenza: United Kingdom first wave (May-September 2009). *Thorax*. 2010;65(7):645–51.
85. Sabogal Piñeros YS, Bal SM, Dijkhuis A, Majoer CJ, Dierdorp BS, Dekker T, et al. Eosinophils capture viruses, a capacity that is defective in asthma. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol*. 2019;74(10):1898–909.
86. Taubenberger JK, Kash JC. Influenza virus evolution, host adaptation, and pandemic formation. *Cell Host Microbe*. 2010;7(6):440–51.
87. Petrova VN, Russell CA. The evolution of seasonal influenza viruses. *Nat Rev Microbiol*. 2018; 16(1):47–60.
88. Influenza Seasonal Fact Sheet. World Health Organization. 2016. Available from: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/influenza-\(seasonal\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/influenza-(seasonal)) .
89. Influenza (Avian and other zoonotic) Fact Sheet. World Health Organization. 2018. [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/influenza-\(avian-and-otherzoonotic\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/influenza-(avian-and-otherzoonotic)).
90. Kumlin U, Olofsson S, Dimock K, Arnberg N. Sialic acid tissue distribution and influenza virus tropism. *Influenza Other Respi Viruses*. 2008;2(5):147–54.
91. Varki A. Sialic acids in human health and disease. *Trends Mol Med*. 2008;14(8):351–60.
92. Kreijtz JH, Fouchier RA, Rimmelzwaan GF. Immune responses to influenza virus infection. *Virus Res*. 2011;162(1–2):19–30.
93. Iwasaki A, Pillai PS. Innate immunity to influenza virus infection. *Nat Rev Immunol*. 2014;14(5):315–28.
94. Chen X, Liu S, Goraya MU, Maarouf M, Huang S, Chen JL. Host immune response to influenza A virus infection. *Front Immunol*. 2018; 9:320.
95. Yoneyama M, Onomoto K, Jogi M, Akaboshi T, Fujita T. Viral RNA detection by RIG-I-like receptors. *Curr Opin Immunol*. 2015;32:48–53.
96. Thomas PG, Dash P, Aldridge JR, Ellebedy AH, Reynolds C, Funk AJ, et al. The Intracellular Sensor NLRP3 Mediates Key Innate and Healing Responses to Influenza A Virus via the Regulation of Caspase-1. *Immunity*. 2009;30(4):566–75.
97. Goraya MU, Zaighum F, Sajjad N, Anjum FR, Sakhawat I, Rahman S ur. Web of interferon stimulated antiviral factors to control the influenza A viruses replication. *Microb Pathog*. 2020;139:103919.
98. Valkenburg SA, Rutigliano JA, Ellebedy AH, Doherty PC, Thomas PG, Kedzierska K. Immunity to seasonal and pandemic influenza A viruses. *Microbes Infect*. 2011;13(5):489–501.
99. Umut Karakus, Michel Crameri, Caroline Lanz and EY. Influenza Virus. *Methods and Protocols*, Chapter 4: Propagation and Titration of Influenza Viruses. Vol. 3, Humana Press, New York, NY 2001. 56–74 p.
100. Sauer AK, Liang CH, Stech J, Peeters B, Quéré P, Schwegmann-Wessels C, et al. Characterization of the sialic acid binding activity of influenza A viruses using soluble variants of the H7 and H9 hemagglutinins. *PLoS One*. 2014;9(2):1–9.
101. Tiwary M, Rooney RJ, Liedmann S, LeMessurier KS, Samarasinghe AE. Eosinophil Responses at the Airway Epithelial Barrier during the Early Phase of Influenza A Virus Infection in C57BL/6 Mice. *Cells*. 2021;10(3).
102. Mansson A, Cardell L-O. Role of atopic status in Toll-like receptor (TLR)7- and TLR9-mediated activation of human eosinophils. *J Leukoc Biol*. 2009; 85(4):719–27.

103. Zhang Z, Huang T, Yu F, Liu X, Zhao C, Chen X, et al. Infectious Progeny of 2009 A (H1N1) influenza virus replicated in and released from human neutrophils. *Sci Rep.* 2015;5:1–11.
104. Rosenberg HF, Domachowske JB. Eosinophils, ribonucleases and host defense: solving the puzzle. *Immunol Res.* 1999; 20(3):261–74.
105. Malachowa N, Freedman B, Sturdevant DE, Kobayashi SD, Nair V, Feldmann F, et al. Differential Ability of Pandemic and Seasonal H1N1 Influenza A Viruses To Alter the Function of Human Neutrophils. *mSphere.* 2018;3(1):1–16.
106. Van Reeth K. Cytokines in the pathogenesis of influenza. *Vet Microbiol.* 2000;74(1–2):109–16.
107. Petering H, Götze O, Kimmig D, Smolarski R, Kapp A, Elsner J. The biologic role of interleukin-8: Functional analysis and expression of CXCR1 and CXCR2 on human eosinophils. *Blood.* 1999;93(2):694–702.
108. Lee JJRHF. Chapter 6 - Eosinophil Trafficking. *Eosinophils in Health and Disease.* Lee JJRHF, editor. 2013;121–66.
109. Carmo LAS, Bonjour K, Spencer LA, Weller PF, Melo RCN. Single-cell analyses of human eosinophils at high resolution to understand compartmentalization and vesicular trafficking of interferon-gamma. *Front Immunol.* 2018;9:1542.
110. LeMessurier KS, Rooney R, Ghoneim HE, Liu B, Li K, Smallwood HS, et al. Influenza A virus directly modulates mouse eosinophil responses. *J Leukoc Biol.* 2020;108(1):151–68.
111. Jureka AS, Kleinpeter AB, Tipper JL, Harrod KS, Petit CM. The influenza NS1 protein modulates RIG-I activation via a strain-specific direct interaction with the second CARD of RIG-I. *J Biol Chem.* 2020;295(4):1153–64.
112. Benitez AA, Panis M, Xue J, Varble A, Shim J V., Frick AL, et al. In Vivo RNAi Screening Identifies MDA5 as a Significant Contributor to the Cellular Defense against Influenza A Virus. *Cell Rep.* 2015;11(11):1714–26.
113. Percopo CM, Dyer KD, Ochkur SI, Luo JL, Fischer ER, Lee JJ, et al. Activated mouse eosinophils protect against lethal respiratory virus infection. *Blood.* 2014;123(5):743–52.
114. He SH, Song CH, Liu Z, Zhang H, Ma W, Zhou LF, et al. Eosinophil-derived interferon-lambda contributes to initiation of allergen-related inflammation in the intestine. *Cytokine.* 2012;58(2):186–92.
115. Mathur SK, Fichtinger PS, Kelly JT, Lee WM, Gern JE, Jarjour NN. Interaction between allergy and innate immunity: Model for eosinophil regulation of epithelial cell interferon expression. *Ann Allergy, Asthma Immunol.* 2013; 111(1):25–31.
116. Edwards MR, Strong K, Cameron A, Walton RP, Jackson DJ, Johnston SL. Viral infections in allergy and immunology: How allergic inflammation influences viral infections and illness. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 2017; 140(4):909–920.
117. Johansson MW. Activation states of blood eosinophils in asthma. *Clinical and Experimental Allergy.* 2014; 44(4):482–98.
118. Ma M, Redes JL, Percopo CM, Druey KM, Rosenberg HF. *Alternaria alternata* challenge at the nasal mucosa results in eosinophilic inflammation and increased susceptibility to influenza virus infection. Vol. 48, *Clinical and Experimental Allergy.* 2018. 691–702.
119. Vabret N, Britton GJ, Gruber C, Hegde S, Kim J, Kuksin M, et al. Immunology of

- COVID-19: Current State of the Science. *Immunity*. 2020;52(6):910–41.
120. Ho KS, Howell D, Rogers L, Narasimhan B, Verma H, Steiger D. The relationship between asthma, eosinophilia, and outcomes in coronavirus disease 2019 infection. *Ann Allergy, Asthma Immunol*. 2021;2–8.
 121. Jesenak M, Brndiarova M, Urbancikova I, Rennerova Z, Vojtkova J, Bobcakova A, et al. Immune Parameters and COVID-19 Infection – Associations With Clinical Severity and Disease Prognosis. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020;10:1–10.
 122. Cañas A, Barroso B, Betancor D, Ortega-martin L, Go A, Mah I. Eosinophils and Chronic Respiratory Diseases in Hospitalized COVID-19 Patients. 2021;12:1–10.
 123. Lindsley AW, Schwartz JT, Rothenberg ME. Eosinophil responses during COVID-19 infections and coronavirus vaccination. *J Allergy Clin Immunol*. 2020;146(1):1–7.
 124. Price DB, Rigazio A, Campbell JD, Bleecker ER, Corrigan CJ, Thomas M, et al. Blood eosinophil count and prospective annual asthma disease burden: A UK cohort study. *Lancet Respir Med*. 2015; 3(11):849-58.
 125. Vedel-Krogh S, Nielsen SF, Lange P, Vestbo J, Nordestgaard BG. Blood eosinophils and exacerbations in chronic obstructive pulmonary disease: The copenhagen general population study. *Am J Respir Crit Care Med*. 2016; 193(9):965-74.
 126. Bjerregaard A, Laing IA, Backer V, Sverrild A, Khoo SK, Chidlow G, et al. High fractional exhaled nitric oxide and sputum eosinophils are associated with an increased risk of future virus-induced exacerbations: A prospective cohort study. *Clin Exp Allergy*. 2017; 47(8):1007-1013.
 127. Rosenberg HF, Dyer KD, Domachowske JB. Respiratory viruses and eosinophils: exploring the connections. *Antivir Res*. 2009;83(1):1–9.